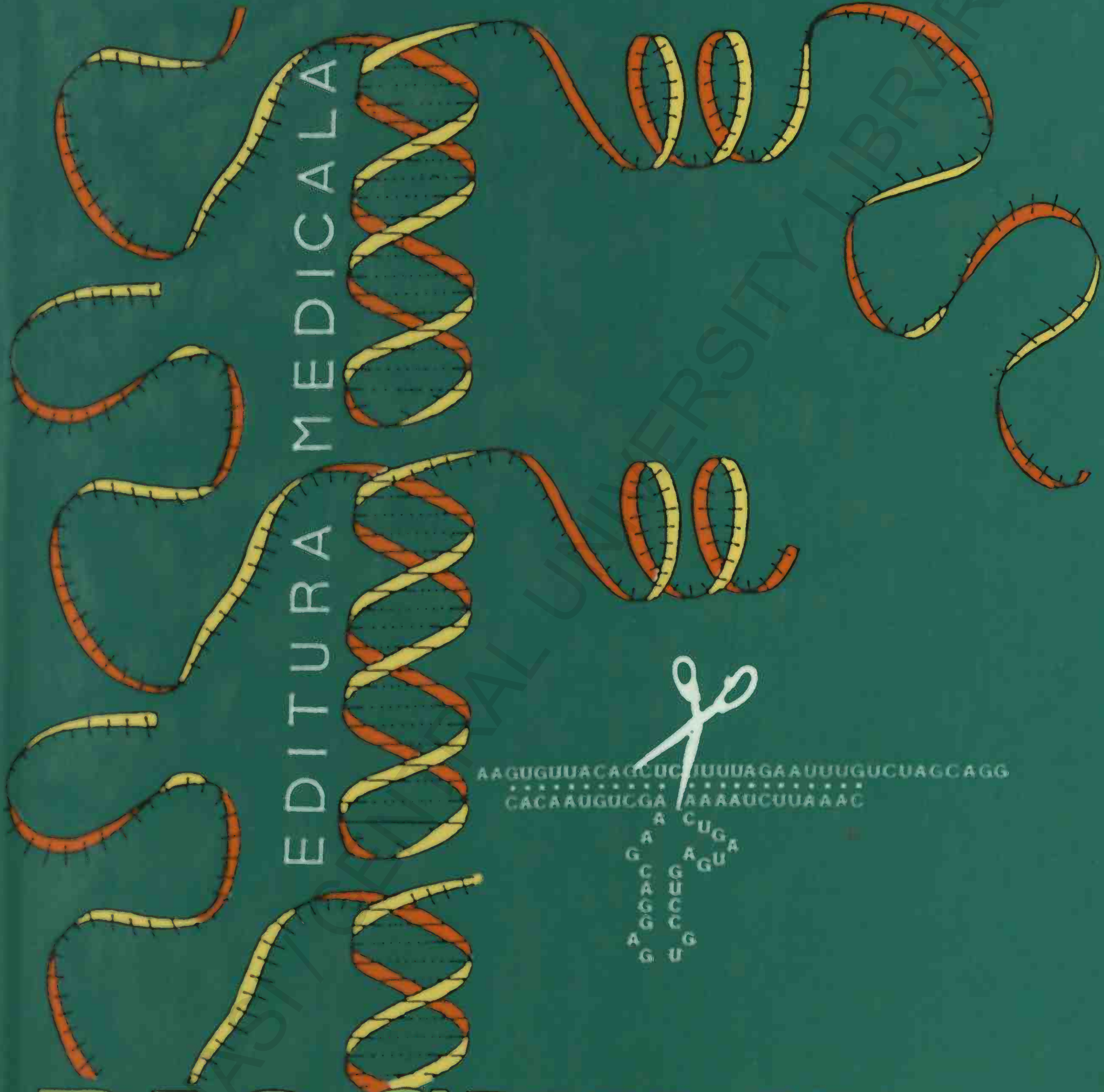
Veronica DINU • Eugen TRUTIA
Elena Popa-CRISTEA • Aurora POPESCU

EDITURA MEDICALĂ



BIOCHIMIE

IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prefaţă

În domeniul ştiinţelor biologice progresele tehnologiei moderne au permis extinderea şi aprofundarea studiilor referitoare la diverşi constituenţi celulari sau subcelulari. Totodată, utilizarea metodelor moderne de investigaţie ştiinţifică în domeniu au evidenţiat şi noi roluri sau mecanisme de acţiune - mai mult sau mai puţin complexe - ale unor asemenea constituenţi. Datorită acestor fapte, însuşi obiectul de studiu al biochimiei - în general - şi al biochimiei medicale - în particular - şi-au lărgit sau şi-au aprofundat conţinutul propriu. De asemenea, în ceea ce priveşte obiectul biochimiei medicale, investigaţiile moderne de cercetare au relevat noi şi multiple implicaţii - din ce în ce mai strânse - pe care le are această disciplină cu diverse alte discipline medicale (genetica, fiziologia, fiziopatologia, farmacologia, medicina internă etc.). Se înţelege că în asemenea condiţii se impunea întocmirea unui nou tratat pentru studiul biochimiei medicale care să cuprindă într-un tot util atât unele cunoştinţe clasice cât şi noile achiziţii ale cercetărilor moderne, precum şi evidenţierea relaţiilor existente între procesele biochimice şi funcţiile fiziologice - normale sau patologice - studiate de alte discipline, considerate strict - medicale. În mod deosebit apărea necesar să fie relevate mecanismele moleculare care stau la baza declanşării unor boli.

În vederea realizării tuturor acestor deziderate s-a elaborat lucrarea de faţă care cuprinde: studiul proteinelor, studiul enzimelor, transferul de informaţie, hormonii şi mecanismele de reglare metabolică, energetica biochimică, marile metabolisme, echilibrul acido-bazic, matricea extracelulară şi noţiuni de biochimia nutriţiei.

Pe lângă caracterul didactic care face ca lucrarea să poată fi utilizată de studenţi pentru însuşirea învăţământului de biochimie, adresabilitatea acestei biochimii medicale este mai largă, considerând-o folositoare atât medicilor cât şi biologilor; în special, celor care-şi desfăşoară activitatea profesională în laboratoare clinice.

În dorinţa realizării unui text uşor de urmărit şi reţinut, lucrarea este însoţită de material ilustrativ bogat cuprinzând numeroase scheme, tabele şi tablouri sinoptice.

Referitor la bibliografia care a stat la baza elaborării ei trebuie subliniat faptul că deşi ea a fost vastă, s-au menţionat aici publicaţiile mai recente şi mai importante, prezentându-se deci o bibliografie selectivă.

Autorii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Cap. I. Proteinele. Structură generală. (Prof. Dr. Elena Popa-Cristea) ... 13

I.1 Aminoacizii ... 14
I.2 Peptidele ... 29
I.3. Proteinele ... 30
I.3.1 Structura primară a proteinelor. ... 32
I.3.2 Organizarea spațială a moleculelor proteice. ... 33
Structura secundară a proteinelor. ... 35
Structura terțiară a proteinelor. ... 40
Structura cuaternară a proteinelor. ... 45
I.3.3 Proprietăți generale ale proteinelor. ... 47
I.3.4 Clasificarea proteinelor. ... 49
I.3.5 Proteinele plasmatice. ... 51
Serumalbumina. ... 52
Imunoglobulinele. ... 53
Factori ai coagulării (fibrinogenul). ... 57
I.3.6 Hemoproteinele. ... 62
I.3.7 Fibronectinele. ... 65

Cap. II. Enzimele. (Prof. Dr. E. Truția) ... 67

II.1 Introducere. ... 67
II.2 Scăderea de către enzime a energiei de activare a reacțiilor. Capacitatea catalitică a enzimelor. ... 68
II.3 Specificitatea enzimelor ... 70
II.3.1 Specificitate de reacție. ... 70
II.3.2 Specificitate de substrat. ... 71
II.3.3 Specificitate stereochimică. ... 72
II.4 Structura enzimelor. ... 73
II.4.1 Aspecte generale. ... 73
II.4.2 Enzime cu structură proteică. ... 74
II.4.3 Enzime cu structură heteroproteică. ... 75
II.5 Sisteme (complexe) multienzimatice. ... 77
II.6 Izoenzime. ... 77
II.7 Centrul activ și mecanismul de acțiune a enzimelor. ... 78
II.8 Cinetica enzimatică. ... 83
II.8.1 Exprimarea vitezei reacțiilor enzimatice. Activitatea enzimelor. ... 83
II.8.2 Viteza inițială a reacțiilor enzimatice. ... 84
II.8.3 Influența pH-ului și temperaturii asupra activității enzimelor. ... 85
II.8.4 Influența concentrației enzimei. ... 86
II.8.5 Influența concentrației substratului. Ecuația Michaelis-Menten. ... 88
II.8.6 Determinarea experimentală a K_M. Semnificația acestei constante. Constanta catalitică, K_{cat}. ... 90
II.8.7 Ecuația Lineweaver-Burk. ... 92
II.8.8 Inhibiția activității enzimelor. ... 92

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.9 Reglarea biosintezei şi activităţii enzimelor. 95
II.9.1 Aspecte generale 95
II.9.2 Reglarea cantităţii enzimelor. 96
II.9.3 Reglarea alosterică a activităţii enzimelor. 97
II.9.4 Reglarea alosterică a funcţiei hemoglobinei. 102
II.9.5 Reglarea covalentă a activităţii enzimelor. 107
II.10 Localizarea intracelulară a enzimelor. 109
II.11 Enzimele şi patologia. 110
II.12 Clasificarea şi denumirea enzimelor. 112

Cap. III. Vitamine şi coenzime. (Prof. Dr. doc. Aurora Popescu). 114

III.1 Generalităţi 114
III.2 Clasificarea vitaminelor 114
III.3 Vitaminele hidrosolubile şi rolurile lor coenzimatice. 115
III.3.1 Complexul B 115
Vitamina B_1 (tiamina) şi coenzima tiaminpirofosfat 115
Vitamina B_2 (riboflavina) şi coenzimele flavinice. 117
Vitamina PP (niacina) şi coenzimele nicotinamidice. 118
Vitamina B_6 (piridoxina) şi coenzimele derivate. 120
Acidul pantotenic şi coenzima A. 122
Biotina şi rolul ei coenzimatic. 123
Vitamina B_{12} (ciancobalamina) şi rolul ei coenzimatic. 124
Acidul folic şi coenzimele derivate. 126
III.3.2 Vitamina C (acidul ascorbic). 128
III.4 Vitaminele liposolubile. 130
III.4.1 Vitamina A (retinolul). 130
III.4.2 Vitamina D. 133
III.4.3 Vitamina E. 135
III.4.4 Vitamina K. 136

Cap. IV. Acizii nucleici. (Prof. Dr. Veronica Dinu). 139

IV.1 Introducere. 139
IV.2 Structura chimică a acizilor nucleici. 140
IV.2.1 Bazele azotate din structura acizilor nucleici. 140
IV.2.2 Nucleozide şi nucleotide din structura acizilor nucleici. 142
IV.2.3 Nucleotide naturale libere. 145
IV.2.4 Analogi structurali ai bazelor azotate şi nucleozidelor. 146
IV.2.5 Structura covalentă a acizilor nucleici. 148
IV.2.6 Caracteristici fizico-chimice ale acizilor nucleici. 150
Denaturarea şi renaturarea ADN. 150
Hidroliza acizilor nucleici. 152
IV.3 Acizii dezoxiribonucleici. 153
IV.3.1 Structura covalentă a ADN. 154
IV.3.2 Conformaţia moleculei de ADN; tipuri de conformaţii. 154
IV.3.3 Organizarea materialului genetic la procariote şi eucariote. 158
IV.3.4 Arhitectura genomului eucariot. 160
IV.3.5 Biosinteza ADN (replicarea). 162
Replicarea la procariote. 165
Replicarea la eucariote. 172
Sinteza de ADN pe matriţă de ARN. 174
IV.4 Acizii ribonucleici. 175
IV.4.1 Tipuri de ARN. 175
ARN mesager (ARN_m). 177
ARN de transfer (ARN_t). 178
ARN ribozomal (ARN_r). 180
ARN nuclear de mici dimensiuni. 181
IV.4.2 Biosinteza ARN pe matriţă de ADN (transcrierea). 181
Transcrierea la procariote. 182
Transcrierea la eucariote. 187
Inhibitori ai transcrierii. 188
IV.4.3 Prelucrări co- şi posttranscriere ale moleculelor de ARN. 188
Excizia intronilor din transcriptele primare. 190
Modificări posttranscriere adiţionale. 197
IV.4.4 Biosinteza ARN pe matriţă de ARN. 201

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. V. Biosinteza proteinelor (traducerea mesajului genetic). (Prof. Dr. Veronica Dinu). 203
V.1 Codul genetic. 203
V.2 Biosinteza proteinelor. 206
V.3 Prelucrări posttraducere ale moleculelor proteice. 216
V.4 Reglarea biosintezei proteinelor. 219
V.5 Leziuni ale moleculelor de ADN şi repararea acestora. Mutaţii. 225
V.5.1 Repararea prin excizie-resinteză. 227
V.5.2 Repararea prin reversarea leziunilor. 230
V.5.3 Mutaţii. 230
V.6 Exprimarea fenotipică a mutaţiilor. 231
V.7 Clonarea genelor. 232
V.7.1 Clonarea genelor in vivo (Tehnologia ADN recombinant). 232
V.7.1.1. „Scenariul" clonării genelor; obţinerea ADN recombinat. 233
V.7.1.2. Exprimarea fenotipică a informaţiei cuprinsă în ADN recombinant. . . 242
V.7.2 Clonarea genelor in vitro (Reacţia polimerazică în lanţ). 246
V.7.3 Aplicaţii ale clonării genelor. 248
(Determinarea secvenţei nucleotidelor în oligonucleotide). 248
Acizi nucleici antisens. 253
Tehnica de transfer Southern. 253

Cap. VI. Energetica biochimică. (Prof. Dr. E.Truţia). 259
VI.1 Aspecte generale. 259
VI.2 Sisteme termodinamice. Funcţii de stare. Principiile termodinamicii. . . . 260
VI.3 Sistemele vii sunt caracterizate cel mai bine prin energia liberă. 262
VI.4 Variaţia energiei libere în reacţiile chimice şi biochimice. 262
VI.4.1 Variaţia energiei libere şi constanta de echilibru. Energia liberă de reacţie standard. 263
VI.4.2 Variaţia energiei libere în reacţiile de oxido-reducere.
Potenţialul redox şi legătura lui cu energia liberă. 265
VI.5 Cuplarea reacţiilor endergonice cu cele exergonice. Intermediarul energetic comun. 266
VI.6 Legături macroergice. Sistemul ATP/ADP, principalul intermediar energetic
comun (Compus macroergic). 268
VI.7 Alţi compuşi macroergici. Potenţialul de transfer al grupării fosfat. . . . 271
VI.8 Căile de sinteză a ATP in vivo. 273
VI.8.1 Fosforilarea la nivel de substrat. 274
VI.8.2 Lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă. 275
VI.8.3 Teorii privind mecanismul cuplării lanţ respirator-fosforilare oxidativă. . . . 284
VI.8.4 Sisteme de transport a echivalenţilor de reducere. 286
VI.8.5 Afecţiuni datorate unor defecte ereditare la nivelul enzimelor lanţului respirator
şi fosforilării oxidative. 288
VI.8.6 Controlul respirator. 288
VI.8.7 Decuplanţi ai fosforilării oxidative de lanţul respirator. 289
VI.8.8 Alte lanţuri respiratorii. 289
VI.8.9 Specii incomplet reduse ale oxigenului. 290

Cap. VII. Metabolismul glucidelor. (Prof. Dr. Veronica Dinu). 294
VII.1 Chimia glucidelor. 294
VII.1.1 Monozaharidele. 295
Stereoizomeria monozaharidelor. 295
Structurile ciclice ale monozaharidelor. 298
Aminozaharuri. 303
Dezoxizaharuri. 304
Proprietăţile fizice şi chimice ale monozaharidelor. 305
VII.1.2 Oligozaharidele. 308
VII.1.3 Polizaharidele. 310
VII.2 Digestia şi absorbţia glucidelor. 312
VII.2.1 Deficite enzimatice în digestia şi absorbţia glucidelor. 315
VII.3 Căile de metabolizare a glucozei. 316
VII.3.1 Glicoliza (Secvenţa Embden-Meyerhof-Parnas). 318
Bilanţul energetic al glicolizei. 328
VII.3.2 Decarboxilarea oxidativă a piruvatului. 329
VII.3.3 Ciclul acizilor tricarboxilici (Ciclul Krebs). 333
Ciclul Krebs - cale amfibolică. 339
Bilanţul energetic al arderii glucozei. 341

VII.4 Alte căi de metabolizare a glucozei. . . . 342
VII.4.1 Calea pentozo-fosfaţilor (Suntul pentozo-fosfat). . . . 342
Deficienţe ale unor enzime implicate în calea pentozelor. . . . 351
VII.4.2 Calea acidului glucuronic. . . . 351
VII.5 Gluconeogeneza. . . . 353
VII.5.1 Reglarea alosterică a gluconeogenezei. . . . 362
VII.5.2 Reglarea hormonală a gluconeogenezei. . . . 363
VII.6 Metabolismul glicogenului. . . . 364
VII.6.1 Degradarea glicogenului (Glicogenoliza). . . . 366
Reglarea glicogenolizei. . . . 368
VII.6.2 Biosinteza glicogenului (Glicogenogeneza). . . . 371
Reglarea glicogenogenezei. . . . 373
VII.6.3 Alterări enzimatice în metabolismul glicogenului. . . . 376
VII.7 Metabolismul galactozei. . . . 377
VII.8 Metabolismul fructozei. . . . 379
VII.9 Glicoproteinele. . . . 382
VII.9.1 Biosinteza glicoproteinelor. . . . 384
VII.9.2 Semnificaţia biologică a glicoproteinelor. . . . 387
VII.10 Proteoglicanii. . . . 388

Cap. VIII. Metabolismul lipidelor. (Prof. Dr. Elena Popa-Cristea). . . . 394
VIII.1 Chimia lipidelor. . . . 394
VIII.1.1 Acizii graşi 394
VIII.1.2 Acilglicerolii (Gliceridele sau grăsimile neutre). . . . 397
VIII.1.3 Fosfogliceridele (Glicerofosfolipidele, fosfatidele). . . . 399
Acizii fosfatidici 399
Fosfatidilcolinele (lecitine) 400
Fosfatidiletanolaminele 402
Fosfatidilserinele (serin-cefaline). . . . 402
Fosfatidilinozitolii (inozitol fosfatide, fosfoinozitide). . . . 402
Plasmalogenele 404
Fosfatidilglicerolii 404
VIII.1.4 Sfingolipidele. . . . 404
Sfingomielinele. . . . 405
Glicosfingolipidele. . . . 405
VIII.1.5 Cerurile. . . . 407
VIII.1.6 Lipide nesaponifiabile. . . . 407
Terpenele. . . . 407
Carotenoizii. . . . 409
Steroizii. . . . 410
VIII.2 Digestia şi absorbţia lipidelor. . . . 415
VIII.3 Metabolismul acizilor graşi. . . . 417
VIII.3.1 Degradarea oxidativă a acizilor graşi. . . . 417
β - Oxidarea acizilor graşi (Ciclul sau spirala lui Lynen). . . . 418
β - Oxidarea acizilor graşi nesaturaţi. . . . 421
Oxidarea acizilor graşi în peroxizomi. . . . 422
VIII.3.2 Cetogeneza. . . . 424
VIII.3.3 Biosinteza acizilor graşi. . . . 427
Biosinteza acidului palmitic. . . . 427
Elongarea acizilor graşi. . . . 432
Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi. . . . 433
VIII.4 Metabolismul glicerolului. . . . 434
VIII.5 Metabolismul triacilglicerolilor. . . . 435
VIII.5.1 Hidroliza triacilglicerolilor. . . . 436
VIII.5.2 Biosinteza triacilglicerolilor. . . . 437
VIII.6 Metabolismul glicerofosfolipidelor. . . . 441
VIII.7 Metabolismul sfingolipidelor. . . . 445
VIII.8 Metabolismul colesterolului. . . . 448
VIII.8.1 Digestia şi absorbţia colesterolului. . . . 450
VIII.8.2 Biosinteza colesterolului. . . . 450
VIII.8.3 Catabolismul colesterolului. . . . 455
VIII.9 Lipidele plasmatice. . . . 457
VIII.9.1 Analiza lipidelor plasmatice. . . . 458
VIII.9.2 Chilomicronii. . . . 461

VIII.9.4 Lipoproteinele cu densitate mică (LDL, β-lipoproteine). 464
VIII.9.5 Lipoproteinele cu densitate mare (HDL, α-lipoproteine). 466
VIII.9.6 Acizii graşi liberi (AGL, acizi graşi neesterificaţi). 467
VIII.9.7 Dislipidemiile. 467
VIII.10 Eicosanoizii. 471
VIII.10.1 Biosinteza eicosanoizilor. 473
VIII.10.2 Catabolismul prostaglandinelor. 476
VIII.10.3 Acţiunile biologice ale eicosanoizilor. 476

Cap. IX. Metabolismul proteinelor şi al aminoacizilor. (Prof. Dr. E.Truţia). 479
IX.1 Introducere. 479
IX.2 Starea dinamică a proteinelor. Bilanţuri azotate. 479
IX.3 Digestia proteinelor alimentare şi absorbţia aminoacizilor. Hidroliza proteinelor endogene. 481
IX.4 Fondul de aminoacizi. Aminoacizii esenţiali. 485
IX.5 Catabolismul aminoacizilor: dezaminarea oxidativă şi ciclul ureogenetic. 486
IX.5.1 Aspecte generale. 486
IX.5.2 Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor şi transportul amoniacului rezultat. 486
IX.5.3 Biosinteza ureei. 490
IX.5.4 Relaţii între ciclul ureogenetic şi ciclul acizilor tricarboxilici. 493
IX.5.5 Boli cauzate de defecte în metabolizarea amoniacului. 493
IX.6 Catabolismul aminoacizilor; utilizarea scheletelor de carbon. 494
IX.6.1 Aspecte generale. 494
IX.6.2 Alanina, treonina, glicina, serina, cisteina (şi cistina) se degradează la acid piruvic. 495
IX.6.3 Arginina, prolina, histidina, glutamina şi acidul glutamic se degradează la acid α-cetoglutaric. 497
IX.6.4 Aspargina şi acidul aspartic se degradează la oxaloacetat. 499
IX.6.5 Izoleucina, valina şi metionina se degradează la succinil-CoA. 499
IX.6.6 Leucina şi lizina se degradează la acid acetoacetic sau acetoacetil-CoA. 502
IX.6.7 Triptofanul se degradează la acetil-CoA şi alanină. 503
IX.6.8 Fenilalanina şi tirozina se degradează la acid fumaric şi acid acetoacetic. 503
IX.6.9 Boli cauzate de defecte în utilizarea scheletului de carbon al aminoacizilor. 506
IX.7 Biosinteza aminoacizilor neesenţiali. 508
IX.7.1 Aspecte generale. 508
IX.7.2 Căi particulare de biosinteză. 510
IX.8 Formarea din aminoacizi a unor compuşi cu funcţii specializate. 513
IX.8.1 Compuşii rezultaţi prin decarboxilarea aminoacizilor. 513
IX.8.2 Biosinteza glutationului. 515
IX.8.3 Sinteza creatinei. Relaţia creatină - creatinfosfat. Creatinina. 516
IX.8.4 Compuşi de „conjugare" a aminoacizilor. 517

Cap. X. Metabolismul hemoproteinelor. (Prof.Dr. E.Truţia) 519
X.1 Aspecte chimice. 519
X.2 Biosinteza hemului. 521
X.2.1 Etapele biosintezei. 521
X.2.2 Reglarea biosintezei hemului. 525
X.2.3 Porfiriile. 526
X.3 Catabolismul hemului. 529
X.3.1 Etapele iniţiale. 529
X.3.2 Bilirubina: formare, pătrundere în ficat, caracteristici, conjugare, excreţie biliară. 530
X.3.3 Etapele finale. 533
X.3.4 Hiperbilirubinemiile. 534

Cap. XI. Metabolismul nucleotidelor purinice şi pirimidinice. (Prof. Dr. Elena Popa-Cristea). 538
XI.1 Metabolismul nucleotidelor purinice. 538
XI.1.1 Biosinteza de novo a nucleotidelor purinice. 540
Biosinteza IMP. 540
Biosinteza AMP şi GMP. 542
Biosinteza nucleotidelor cu legături fosfat macroergice. 544
Biosinteza dezoxiribonucleotidelor. 544
Reglarea biosintezei de novo a purinelor. 544
XI.1.2 Interconversiunile şi reutilizarea purinelor. 546
XI.1.3 Catabolismul purinelor 551
XI.1.4 Patologia metabolismului purinelor. 553

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XI.2 Metabolismul nucleotidelor pirimidinice. 554
XI.2.1 Biosinteza de novo a nucleotidelor pirimidinice. 555
XI.2.2 Reutilizarea şi catabolismul nucleotidelor pirimidinice. 560
XI.2.3 Patologia metabolismului pirimidinelor. 561

Cap. XII. Hormonii. (Prof. Dr. Elena Popa-Cristea) 562

XII.1 Introducere 562
XII.2 Receptorii hormonali. 564
XII.3 Mecanismele de acţiune a hormonilor. 571
XII.3.1 Mecanismul de acţiune a hormonilor steroidici şi tiroidieni. 571
XII.3.2 Mecanismul de acţiune a hormonilor peptidici şi a catecolaminelor. 572
Proteinele G. 573
AMP_c, adenilat ciclaza şi AMP_c fosfodiesteraza. 576
Protein kinaze şi fosfoproteinfosfataze. 577
AMP_c mediator al expresiei genice 580
GMP_c, guanilat ciclaza şi GMP_c fosfodiesteraza. 581
Fosfolipaza C şi mesagerii intracelulari. Diacilglicerol şi inozitoltrisfosfat. 583
Ca^{2+} mesager intracelular al semnalelor externe. 585
Mecanismul de acţiune a unor hormoni care reglează creşterea şi proliferarea celulară. 586
XII.4 Hormonii tiroidieni. 592
XII.5 Hormonii care reglează calcemia (hormonii calciotropi). 593
XII.5.1 Hormonul paratiroidian. 594
XII.5.2 Calcitonina. 595
XII.5.3 1,25-Dihidroxicolecalciferol (Calcitriol). 598
XII.6 Hormonii pancreatici. 598
XII.6.1 Insulina. 603
XII.6.2 Glucagonul. 604
XII.6.3 Somatostatina. 606
XII.6.4 Polipeptidul pancreatic. 607
XII.7 Hormonii gastrointestinali 608
XII.8 Hormonii medulosuprarenalieni 612
XII.9 Hormonii corticosuprarenalieni. 618
XII.10 Hormonii sexuali. 618
XII.10.1 Androgenii. 622
XII.10.2 Hormonii ovarieni. 624
XII.11 Hormonii hipofizari şi hipotalamici. 624
XII.11.1 Hormonii adenohipofizari. 626
Peptide derivate din pro-opiomelanocortina (POMC). 628
Grupul hormonilor somatomamotropi. 629
Hormonii hipofizari glicoproteici. 630
XII.11.2 Hormonii neurohipofizari. 631
XII.12 Epifiza (glanda pineală). 633
XII.13 Endorfine. 634
XII.14 Factorii de creştere. 635
XII.14.1 Familia EGF (Epidermal growth factor). 635
XII.14.2 Familia FGF (Fibroblast growth factor). 636
XII.14.3 Familia PDGF (Platelet derived growth factor). 636
XII.14.4 Familia TGF β (Transforming growth factor β). 637
XII.14.5 Factorii de creştere insulin-like (IGF, somatomedine). 638
XII.14.6 NGF (Nerve growth factor). 638
XII.14.7 Familia CSF (Colony-stimulating factor). 639
XII.14.8 Eritropoietină (Erythropoesis stimulating factor). 640
XII.14.9 Interleukinele (IL). 641
XII.14.10 Interferonii (INF). 643
XII.14.11 Oncogenele şi controlul creşterii celulare. 643

Cap. XIII. Apa. Procesele hidroelectrolitice şi echilibrul acido-bazic. (Prof. Dr. doc. Aurora Popescu) 643

XIII.1 Introducere. 643
XIII.2 Conţinutul şi repartiţia apei în organism. 643
XIII.3 Echilibrul apei în organism. 647
XIII.3.1 Necesarul zilnic de apă. 648
XIII.3.2 Pierderile de apă. 649
XIII.3.3 Excesul de apă. 649
XIII.4 Proprietăţile fizico-chimice ale apei. 649
XIII.4.1 Structura şi polaritatea moleculei de apă. 649
XIII.4.2 Legătura de hidrogen şi asocierile moleculare. 651

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XIII.4.3 Căldura specifică şi căldura de vaporizare. 653
XIII.4.4 Căldura de topire, punctul de topire şi punctul de fierbere. 654
XIII.4.5 Apa ca dizolvant. 655
XIII.5 Procesele hidroelectrolitice. 658
XIII.5.1 Ionizarea apei şi produsul ionic al apei. 658
XIII.5.2 Reacţia soluţiilor şi pH-ul. 659
XIII.5.3 Specii de acizi şi baze; tăria lor. 661
XIII.6 Echilibrul acido-bazic. 664
XIII.6.1 Sistemul tampon acid carbonic-bicarbonat. 665
XIII.6.2 Sistemul tampon al fosfaţilor. 668
XIII.6.3 Sistemul tampon al proteinelor. 668
XIII.6.4 Sistemul tampon al hemoglobinei. 669
XIII.6.5 Cooperarea plămân-rinichi. 669

Cap. XIV. Matricea extracelulară (Prof. dr. doc. Aurora Popescu). 671

XIV.1 Constituenţii chimici ai matricei extracelulare. 671
XIV.1.1 Proteinele. 671
Colagenul. 672
Elastina. 680
XIV.1.2 Glicozaminoglicanii şi proteoglicanii. 682
Glicozaminoglicanii. 682
Proteoglicanii. 687
Funcţiile biologice ale proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor. 694
Biosinteza şi degradarea proteoglicanilor. 695
XIV.2 Rolul matricei extracelulare în cursul morfogenezei. 698
XIV.3 Modificările constituenţilor matricei extracelulare. 699
XIV.3.1 Modificări în funcţie de vârstă. 699
XIV.3.2 Colagenozele. 700
XIV.3.3 Unele modificări calitative dobândite. 700
XIV.3.4 Mucopolizaharidozele. 701

Cap. XV. Noţiuni de nutriţie (Prof. Dr. doc. Aurora Popescu). 703

XV.1 Introducere. 703
XV.2 Necesarul nutritiv. 703
XV.2.1 Cheltuiala de energie. 704
Metabolismul bazal. 704
Efectele termogenetice. 705
Cheltuiala energetică determinată de activitatea fizică depusă. 705
Necesarul energetic. 706
XV.2.2 Compoziţia şi energia raţiei alimentare. 707
XV.3. Principiile nutritive. 709
XV.3.1 Glucidele. 709
XV.3.2 Lipidele. 710
XV.3.3 Proteinele. 711
XV.3.4 Vitaminele 713
XV.3.5 Mineralele. 716
XV.3.6 Substanţele alimentare bioactive. 719
XV.3.7 Fibrele alimentare. 720
XV.3.8 Apa. 722
XV.4 Principalele produse alimentare. 723
XV.4.1 Produsele alimentare de origine animală. 724
Laptele şi produsele lactate. 724
Ouăle. 725
Carnea. 726
Peştele. 727
XV.4.2 Produsele alimentare de origine vegetală. 728
Cerealele. 728
Legumele. 729
Fructele. 729
XV.4.3 Alte produse alimentare. 732
Produsele zaharoase. 732
Băuturile. 733
Condimentele. 733
XV.4.4 Alimente bogate în aminoacizi esenţiali. 733
XV.4.5 Repartizarea unor principii nutritive în cele mai importante produse alimentare. 734
XV.5 Contribuţia nutriţiei la păstrarea sănătăţii. 736

XIII.4.3 Căldura specifică și căldura de vaporizare
XIII.4.4 Căldura de topire, punctul de topire și punctul de fierbere
XIII.4.5 Apa ca dizolvant
XIII.5 Procesele hidrotermodinamice
XIII.5.1 Ionizarea apei și produsul ionic al apei
XIII.5.2 Reacția soluțiilor și pH-ul
XIII.5.3 Acizi și baze. Sisteme tampon
XIII.6 Echilibrul acido-bazic
XIII.6.1 Sistemul tampon acid carbonic-bicarbonat
XIII.6.2 Sistemul tampon al fosfaților
XIII.6.3 Sistemul tampon al proteinelor
XIII.6.4 Sistemul tampon al hemoglobinei
XIII.6.5 Capacitatea plasmei totale

Cap. XIV. Matricea extracelulară (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

XIV.1 Constituenții chimici ai matricei extracelulare
XIV.1.1 Proteinele
Colagenul
Elastina
XIV.1.2 Glicozaminoglicanii și proteoglicanii
Glicozaminoglicanii
Proteoglicanii
Funcțiile biologice ale proteoglicanilor și glicozaminoglicanilor
Biosinteza și degradarea proteoglicanilor
XIV.2 Rolul matricei extracelulare în creșterea și morfogeneză
XIV.3 Modificările constituenților matricei extracelulare
XIV.3.1 Modificări în timpul vieții
XIV.3.2 Colagenozele
XIV.3.3 Boala mucopolizaharidozelor
XIV.3.4 Mucopolizaharidozele

Cap. XV. Noțiuni de nutriție (Prof. Dr. doc. Aurora Popescu)

XV.1 Introducere
XV.2 Procesul nutritiv
XV.2.1 Cheltuieli de energie
Metabolismul bazal
Efectul termogenetic
Cheltuiala energetică determinată de activitatea fizică
Necesarul energetic
XV.2.2 Compoziția și energia hranei alimentare
XV.3 Principiile nutritive
XV.3.1 Glucidele
XV.3.2 Lipidele
XV.3.3 Proteinele
XV.3.4 Vitaminele
XV.3.5 Mineralele
XV.3.6 Substanțele alimentare fibroase
XV.3.7 Fibrele alimentare
XV.3.8 Apa
XV.4 Principalele produse alimentare
XV.4.1 Produsele alimentare de origine animală
Laptele și produsele lactate
Carnea
Ouăle
Peștele
XV.4.2 Produsele alimentare de origine vegetală
Cerealele
Leguminoasele
Fructele
XV.4.3 Alte produse alimentare
Produsele zaharoase
Băuturile
Condimentele
XV.4.4 Alimentele bogate în acizi grași esențiali
XV.4.5 Importanța unor principii nutritive în cele mai importante produse alimentare
XV.5 Contribuția nutriției la păstrarea sănătății

Cap. I. PROTEINELE. STRUCTURĂ GENERALĂ

Proteinele sunt constituenţi chimici ai organismelor vii cu cel mai înalt grad de complexitate, de varietate moleculară şi care prezintă specificitate de specie, de organ. Denumirea lor derivă de la cuvântul grecesc „proteios" care înseamnă „de prim rang, cel dintâi".

Proteinele sunt substanţe macromoleculare de natură polipeptidică. La construcţia proteinelor participă 20 de aminoacizi fundamentali, aceiaşi la toate vieţuitoarele, de la cea mai simplă bacterie până la om. Prin legare în lanţuri polipeptidice variate ca lungime şi succesiune a unităţilor se poate obţine un număr nesfârşit de combinaţii. Cu toată multiplicitatea posibilităţilor de combinare a aminoacizilor în lanţuri polipeptidice, la un anumit organism nu se realizează decât anumite secvenţe, acelea care sunt specificate de materialul genetic, de ADN parental. Proteinele sunt macromolecule informaţionale, cu secvenţe specifice de aminoacizi, sunt expresia epigenetică a genomului celular.

Proteinele îndeplinesc funcţii fundamentale, specifice organismelor vii *(Tabelul I.1):*

Tabel I.1.

Exemple de proteine şi funcţii îndeplinite de acestea

Proteina	*Funcţia*
Colagenul	Principala proteină a ţesuturilor conjunctive
Histona	Proteină nucleară asociată cu ADN
Spectrina	Proteină eritrocitară cu rol în menţinerea formei celulare
Amilaza	Enzimă, participă la digestia amidonului
Pepsina	Enzimă, participă la digestia proteinelor
Glicogen sintaza	Enzimă, participă la sinteza glicogenului
Lactat dehidrogenaza	Enzimă, catalizează oxidarea lactatului la piruvat
Actina	Proteină contractilă din muşchi
Miozina	Proteină contractilă din muşchi
Insulina	Hormon pancreatic hipoglicemiant
Hormonul de creştere	Hormon hipofizar
Serumalbumina	Proteină plasmatică, transportă ioni, vitamine, hormoni
Hemoglobina	Transportă oxigenul în sistemul circulator
Transferina	Transportă ioni de fier în plasmă
Feritina	Forma de depozitare a fierului
Citocromii	Transportă electroni
Imunoglobulinele	Anticorpi care fixează şi imobilizează agenţii bacterieni
Fibrinogenul	Proteină plasmatică cu rol în coagularea sângelui

- Proteinele au un rol structural major, ele constituie materialul din care sunt construite toate structurile celulare, membrane, organite celulare ca şi materialul intercelular al ţesuturilor şi organelor. Proteinele există într-o varietate moleculară foarte mare şi ele asigură diversitatea şi specificitatea de formă a tuturor fiinţelor vii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Proteinele exercită acţiuni catalitice, determinând varietatea nesfârşită de reacţii biochimice şi specificul transformărilor chimice din organismele vii.

- Proteinele contractile sunt instrumentele cu ajutorul cărora organismele vii îndeplinesc activitatea contractilă şi locomotoare.

- Proteinele îndeplinesc funcţii reglatoare, ele pot stoca şi transmite mesaje chimice diverse.

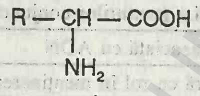
- Proteinele îndeplinesc funcţii de transport şi de depozitare a unor compuşi chimici ca ioni metalici, vitamine, oxigen, dioxid de carbon.

- Proteinele au sarcina de a apăra organismul împotriva unor corpi străini, macromolecule, virusuri, bacterii. Reacţiile imunologice sunt mediate de o clasă de proteine specializate - imunoglobulinele.

I.1. AMINOACIZII

Unităţile constituente ale proteinelor sunt aminoacizii, care prin legătura peptidică între gruparea aminică a unei molecule şi gruparea carboxil a altei molecule dau naştere la macromoleculele proteice. Există 20 aminoacizi proteinogeni specificaţi prin codul genetic, prezenţi în toate organismele vii, de la cele mai simple până la om *(Tabelul I.2)*. Alături de aceşti 20 aminoacizi fundamentali, în proteine se mai întâlnesc alţi câţiva, care rezultă, de fapt, prin modificări chimice ale acestora după încorporare în lanţurile polipeptidice (de ex. hidroxiprolina, hidroxilizina etc.). Totodată, se mai întâlnesc şi unii aminoacizi cu alte funcţii, ca ornitina, citrulina *(Tabelul I.3)*.

Aminoacizii naturali au formula generală:

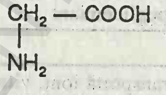


ei sunt α-aminoacizi. Face excepţie unul din cei 20 de aminoacizi,prolina, care are o funcţie aminică secundară.

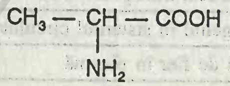
Diversitatea aminoacizilor naturali este dată de natura lui R care poate fi o catenă hidrocarbonată alifatică sau aromatică, un heterociclu sau R poate să cuprindă o funcţie adiţională.

Aminoacizii alifatici (fără grupări funcţionale în R).

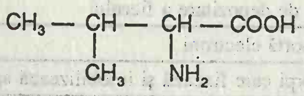
Glicocolul sau glicina:



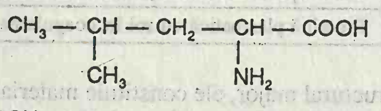
Alanina:



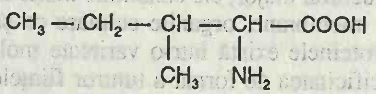
Valina:



Leucina:



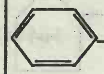
Izoleucina:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

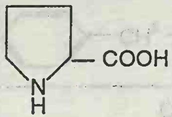
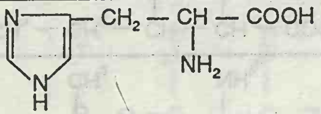
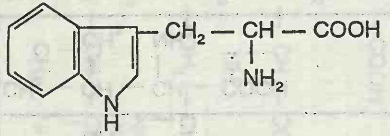
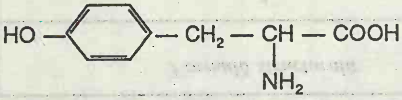
Tabelul I.2

Structurile şi denumirile aminoacizilor proteinogeni

Formulă structurală	*Denumirea uzuală*	*Denumirea raţională*	*Prescurtarea de trei litere*	*Simbol de o literă*
1	2	3	4	5
$CH_2(NH_2)-COOH$	glicocol (glicină)	Acid aminoacetic	Gly	G
$CH_3-CH(NH_2)-COOH$	alanină	Acid α-aminopropionic	Ala	A
$CH_3-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$	valină	Acid α-aminoizovalerianic	Val	V
$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	leucină	Acid α-aminoizocaproic	Leu	L
$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$	izoleucină	Acid α-amino-β-metilvalerianic	Ile	I
 $-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	fenilalanină		Phe	F

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul I.2 (continuare)

1	2	3	4	5
	prolină	Acid pirolidin-α-carboxilic	Pro	P
	Histidină	Acid α-amino-β-imidazolilpropionic	His	H
	Triptofan	Acid α-amino-β-indolilpropionic	Trp	W
$CH_2(OH)-CH(NH_2)-COOH$	Serină	Acid α-amino-β-hidroxipropionic	Ser	S
$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$	Treonină	Acid α-amino-β-hidroxibutiric	Thr	T
	Tirozină	p-hidroxifenilalanină	Tyr	Y
$CH_2(SH)-CH(NH_2)-COOH$	Cisteină	Acid α-amino-β-tiopropionic	Cys	C

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul I.2 (continuare)

1	2	3	4	5
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Metionină	Acid α-amino-S-metil-tiobutiric	Met	M
$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Acid aspartic	Acid aminosuccinic	Asp	D
$H_2NOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Asparagină	Acid α-amino-β-amidosuccinic	Asn	N
$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Acid glutamic	Acid α-aminoglutaric	Glu	N
$H_2NOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Glutamină	Acid α-amino-γ-amidoglutaric	Gln	Q
$CH_2(NH_2)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Lizină	Acid α,ε-diaminocaproic	Lys	K
$NH_2-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Arginină	Acid α-amino-δ-guadininovalerianic	Arg	R

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul I.3

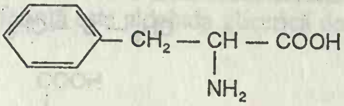
Aminoacizii neproteinogeni

Formulă structurală	*Denumire uzuală*	*Denumire științifică*	*Funcție*
$H_2N-CH_2-CH_2-COOH$	β - Alanina	Acid β-aminopropionic	Component al coenzimei A
$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$	Acid γ-aminobutiric, GABA	—	Neuromodulator
$H_2N-CH_2-CO-CH_2-CH_2-COOH$	Acid δ-aminolevulinic		Intermediar în biosinteza hemului
$H_2N-CO-NH-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$	Citrulina	Acid α-amino-δ-amidinovalerianic	Intermediar al ciclului ureogenetic
$H_2N-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$	Ornitina	Acid α,δ-diaminovalerianic	Intermediar al ciclului ureogenetic
$HS-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Homocisteina	Acid α-amino-γ-tiobutiric	Intermediar în metabolismul aminoacizilor
$HO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Homoserina	Acid α-amino-γ-hidroxibutiric	Intermediar în metabolismul aminoacizilor
$H_2N-C_6H_4-OH$	Acid p-aminobenzoic		Factor de creștere pentru bacterii, component al acidului folic

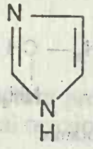
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aminoacizii aromatici (fără grupări funcţionale în R).

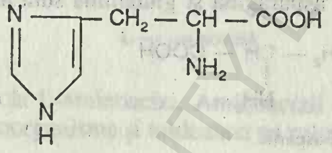
Fenilalanina:



Aminoacizii heterociclici. Histidina cuprinde heterociclul pentagonal cu doi atomi de azot, imidazol.

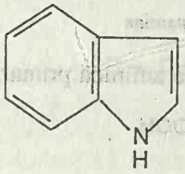


Imidazol

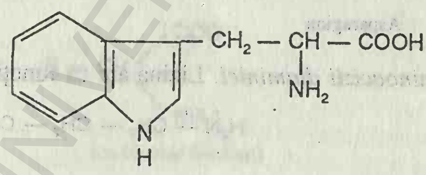


Histidina

Triptofanul cuprinde nucleul heterociclic al indolului:

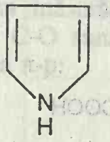


Indol

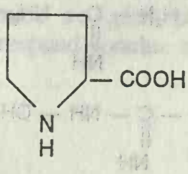


Triptofan

Prolina cuprinde o grupare aminică secundară, situată într-un ciclu derivat din pirol:

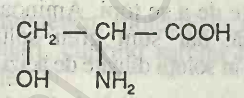


pirol

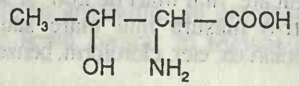


prolină

Aminoacizii cu grupări hidroxilice. Serina şi treonina curpind în R funcţii alcool:

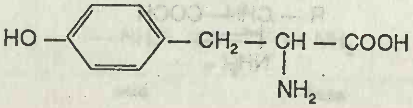


Serina



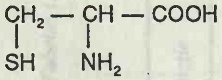
Treonina

Tirozina posedă o funcţie adiţională fenol:

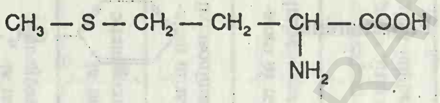


BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aminoacizii cu sulf (tioaminoacizii). Cisteina cuprinde funcţia tiol (R = — SH) şi metionina o funcţie tioeter (R = — S — R):

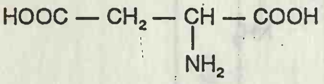


Cisteina

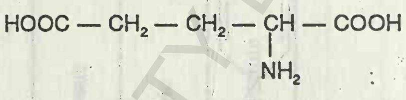


Metionina

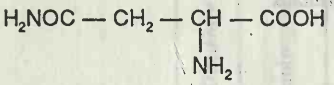
Aminoacizi dicarboxilici. Acidul aspartic şi acidul glutamic sunt acizi monoaminodicarboxilici, iar asparagina şi glutamina sunt amidele lor:



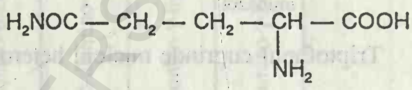
Acidul aspartic



Acidul glutamic

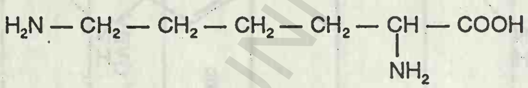


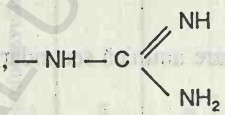
Asparagina

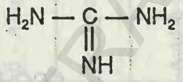


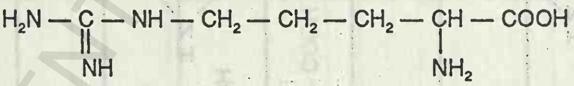
Glutamina

Aminoacizii diaminici. Lizina are ca funcţie adiţională o grupare aminică primară:



Arginina cuprinde o grupare guanidil, 

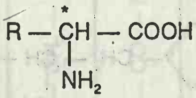
derivată din guanidină,  :



Arginina

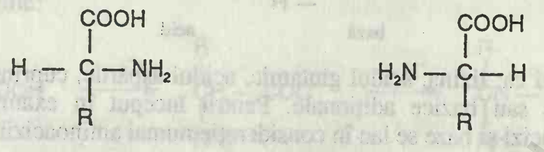
Proprietăţile fizice ale aminoacizilor. Toţi aminoacizii sunt substanţe solide, cu puncte de topire ridicate, mai mari de 200° şi se descompun înainte de a se topi. Aminoacizii se dizolvă, într-o măsură mai mare sau mai mică, în apă, dar sunt greu solubili în solvenţii nepolari ca: eter, cloroform, benzen. Sunt uşor solubili în soluţii diluate de acizi şi baze.

Izomeria optică a aminoacizilor. Toţi aminoacizii, cu excepţia glicocolului, posedă un centru chiralic (un carbon asimetric) care este C_α:



BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

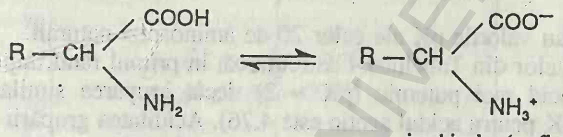
Izoleucina şi treonina au un carbon asimetric adiţional, atomul C_β. Formulele de configuraţie ale enantiomerilor unui aminoacid oarecare, reprezentate în sistemul D-L, în care substanţa de referinţă este aldehida glicerică dextrogiră sunt:



D — aminoacid　　　　L — aminoacid

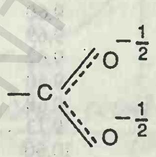
În structura proteinelor nu se întâlnesc decât L-aminoacizi. Aminoacizii din seria D apar numai ocazional, în special la unele microorganisme şi totdeauna au roluri specifice.

Proprietăţile acidobazice ale aminoacizilor. Aminoacizii cuprind o grupare — NH_2 bazică şi una — COOH acidă şi între aceste două funcţii poate avea loc transferul de protoni:



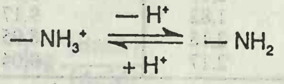
ion bipolar (amfion)

Datorită interacţiunilor electronice posibile între cele două funcţii învecinate, echilibrul reacţiei este deplasat aproape în totalitate spre dreapta, practic aminoacizii (monoaminomonocarboxilici), în cristale ca şi în soluţie, există numai sub formă de amfioni (ioni bipolari). Structura bipolară a aminoacizilor este susţinută de numeroase fapte. Prin măsurători de distanţe interatomice s-a găsit că în gruparea carboxil, distanţele C-O sunt egale (1,26 Å), ele corespund ionului carboxilat, unde are loc conjugarea π-p:



De asemenea, moleculele aminoacizilor, neutre în ansamblu, au momente de dipol foarte mari, cuprind sarcini electrice mari şi de semn contrar în regiuni diferite ale moleculei.

Ionii bipolari ai aminoacizilor rămân în continuare amfoliţi, ei au atât caracter acid, cât şi caracter bazic. Funcţia acidă actuală a unui aminoacid (monoaminomonocarboxilic) este gruparea aminică protonată, — NH_3^+, acidul conjugat al grupării aminice, — NH_2:



acid　　　　baza

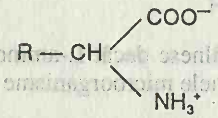
BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Funcţia bazică a unui aminoacid este ionul carboxilat — COO^-, baza conjugată a grupării carboxil:

$$-COO^- \underset{-H^+}{\overset{+H^+}{\rightleftharpoons}} -COOH$$

bază   acid

Unii aminoacizi ca: lizina, acidul glutamic, acidul aspartic, cuprind în radicalul de la C_α grupări acide sau bazice adiţionale. Pentru început în examinarea comportării aminoacizilor ca acizi şi baze se iau în consideraţie numai aminoacizii monoaminomonocarboxilici (aminoacizi neutri):



Pentru caracterizarea acidităţii şi bazicităţii aminoacizilor se folosesc exponenţii de aciditate, pK, ($pK_a = -\log K_a$). Funcţia carboxil este caracterizată prin $pK_{\alpha\text{-}COOH}$ iar funcţia aminică printr-un $pK_{\alpha\text{-}NH_3^+}$. La unii aminoacizi se adaugă o a treia mărime pK, corespunzătoare funcţiei acide adiţionale.

În Tabelul I.4 se dau valorile pK ale celor 20 de aminoacizi naturali.

Din examinarea datelor din Tabelul I.4 se remarcă, în primul rând, faptul că funcţia — COOH este un acid mai puternic (pK ≈ 2) decât gruparea similară a acizilor carboxilici oarecari (pK pentru acidul acetic este 4,76). Aciditatea grupării — NH_3^+ este redusă (pK = 9-10), dar întrece totuşi bazicitatea — COO^-. Din această cauză, în apă pură, gruparea — NH_3^+ donează mai mulţi protoni decât acceptă ionul — COO^-. Soluţiile apoase ale aminoacizilor sunt slab acide.

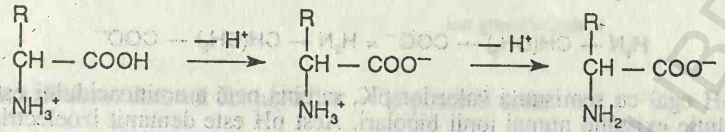
Tabel I.4.

Valorile pK şi pI ale aminoacizilor

Aminoacid	$pK_{\alpha\text{-}COOH}$ (25°)	$pK_{\alpha\text{-}NH_3^+}$ (25°)	pK_R	*pI*
1. Glicocol	2,34	9,60		5,97
2. Alanină	2,35	9,69		6,02
3. Valină	2,32	9,62		5,97
4. Leucină	2,36	9,60		5,98
5. Izoleucină	2,36	9,68		6,02
6. Fenilalanină	1,83	9,13		5,98
7. Prolină	1,99	10,60		6,10
8. Triptofan	2,38	9,38		5,88
9. Serină	2,21	9,15		5,68
10. Treonină	2,63	10,43		6,53
11. Tirozină	2,20	9,11	10,07	5,65
12. Cisteină	1,71	10,78	8,33	5,02
13. Metionină	2,28	9,21		5,75
14. Asparagină	2,02	8,8		5,41
15. Glutamină	2,17	9,13		5,65
16. Acid aspartic	2,09	9,82	3,86	2,97
17. Acid glutamic	2,19	9,67	4,25	3,22
18. Histidină	1,82	9,17	6,00	7,58
19. Lizină	2,18	8,95	10,53	9,74
20. Arginină	2,17	9,04	12,48	10,76

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un aminoacid prin funcţiile acidă şi bazică pe care le cuprinde, poate reacţiona cu baze cedând protoni şi cu acizi, acceptând protoni. Încărcarea electrică a unui aminoacid depinde de pH-ul soluţiei. Dacă un aminoacid se află într-o soluţie puternic acidă (pH = 0-1) grupările acceptoare de protoni sunt protonate în totalitate. La titrarea acestuia cu o bază tare (HO^-) protonii sunt eliberaţi în ordinea descrescătoare a acidităţii funcţiilor acide. Au loc reacţiile:



În fig. I.1 este prezentată curba de titrare a alaninei, a neutralizării funcţiilor — COOH şi — NH_3^+ cu o soluţie de NaOH.

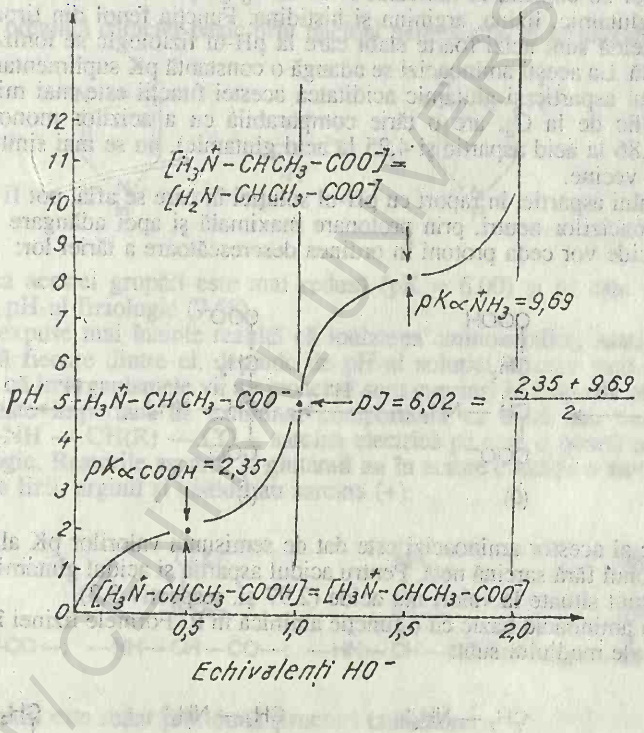


Fig. I.1. — Curba de titrare a alaninei.

Din ecuaţia Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{Bază}]}{[\text{Acid}]}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rezultă că la un pH egal cu $pK_{\alpha\text{-}COOH}$ (2,35) există egalitatea:

$$H_3\overset{+}{N} - CH(CH_3) - COOH = H_3\overset{+}{N} - CH(CH_3) - COO^-$$

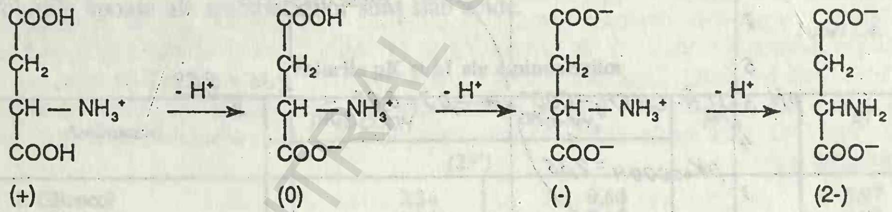
iar la pH = $pK_{\alpha\text{-}NH_3^+}$ (9,69) egalitatea:

$$H_3\overset{+}{N} - CH(CH_3) - COO^- = H_2N - CH(CH_3) - COO^-$$

La un pH egal cu semisuma valorilor pK, sarcina netă a aminoacidului este practic nulă, în soluţie existând numai ionii bipolari. Acst pH este denumit izoelectric (pI). În Tabelul I.4, coloana 5, sunt date valorile pI ale aminoacizilor proteinogeni. Pentru aminoacizii neutri, punctele izoelectrice sunt situate la valori de aproximativ 6, pH puţin inferior pH-ului fiziologic. La pH = pI solubilitatea aminoacizilor este minimă.

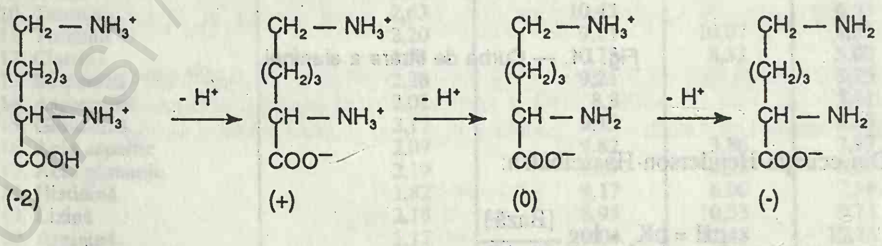
Comportarea aminoacizilor cu grupări acide şi bazice adiţionale. Un număr de 5 aminoacizi din cei 20 cuprind în radicalul R de la C_α grupări acide sau bazice: acidul aspartic, acidul glutamic, lizina, arginina şi histidina. Funcţia fenol din tirozină şi cea tioalcool din cisteină sunt acizi foarte slabi care la pH-ul fiziologic se ionizează într-o măsură neglijabilă. La aceşti aminoacizi se adaugă o constantă pK suplimentară (Tabelul I.4). Pentru acidul aspartic şi glutamic aciditatea acestei funcţii este mai mică decât a grupului carboxilic de la C_α, are o tărie comparabilă cu a acizilor monocarboxilici alifatici (pK = 3,86 la acid aspartic şi 4,25 la acid glutamic), nu se mai simte influenţa grupării aminice vecine.

Formele acidului aspartic, în raport cu pH-ul soluţiei în care se află, pot fi deduse, ca şi în cazul aminoacizilor neutri, prin protonare maximală şi apoi adăugare treptată de bază: funcţiile acide vor ceda protoni în ordinea descrescătoare a tăriei lor:



pH-ul izoelectric al acestor aminoacizi este dat de semisuma valorilor pK ale funcţiilor care generează ionul fără sarcină netă. Pentru acidul aspartic şi acidul glutamic, punctele lor izoelectrice sunt situate la valori net acide (2,97 şi, respectiv 3,2).

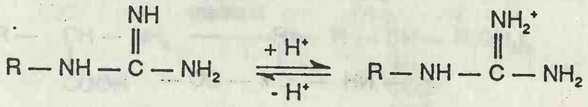
Lizina este un aminoacid bazic cu o funcţie aminică în R. Formele lizinei în raport cu variaţiile de pH ale mediului sunt:



pH-ul izoelectric al lizinei este situat la valorarea 10.

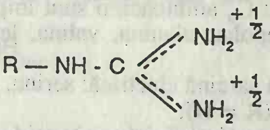
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Arginina are un caracter bazic net prin gruparea guanidinică:

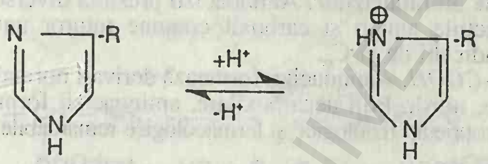


ion guanidinium

Ionul guanidinium, datorită conjugării π — p poate fi scris:

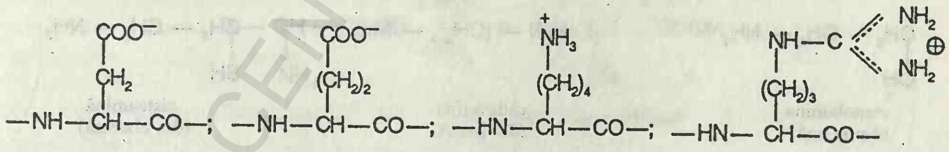


Histidina prezintă caracter bazic prin nucleul heterociclic al imidazolului:

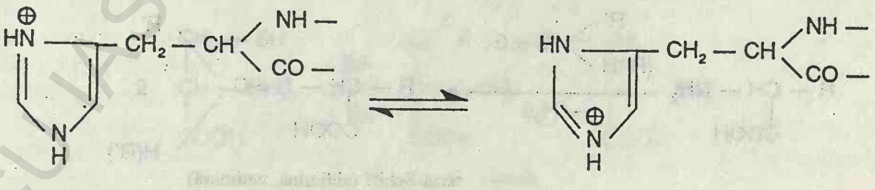


Bazicitatea acestei grupări este mai redusă (pK = 6,00) şi pI este situat la valori apropiate de pH-ul fiziologic (7,58).

Din cele expuse mai înainte rezultă că ionizarea aminoacizilor, sarcina electrică pe care o poartă fiecare dintre ei, depinde de pH-ul soluţiei în care sunt cuprinşi. Dacă ţinem seama că în organismele vii aminoacizii sunt cuprinşi în lanţurile polipeptidice ale proteinelor este important de examinat comportarea ca acizi sau baze a resturilor aminoacide -NH — CH(R) — CO -, sarcina electrică pe care o poartă aceste resturi la pH-ul fiziologic. Resturile aspartil şi glutamil au în aceste condiţii o sarcină netă (-) pe când resturile lizil, arginil şi histidil au sarcina (+):



Restul histidil este redat prin două structuri tautomere:



BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clasificarea aminoacizilor după natura radicalului de la C_α.

În proteine, aminoacizii sunt angajaţi în legătură peptidică prin gruparea aminică şi cea carboxil:

$$-NH-\underset{}{\overset{R}{\overset{|}{CH}}}-CO-$$

rest aminoacidic

Ceea ce diferenţiază resturile celor 20 de aminoacizi este natura radicalului de la C_α. Natura interacţiunilor ce se pot stabili între resturile aminoacidice depinde de încărcarea electrică a acestor resturi, de caracterul lor polar sau hidrofob. Ţinându-se seama de aceste însuşiri ale resturilor R de la C_α aminoacizii sunt împărţiţi în patru grupe.

a. aminoacizi cu R hidrofob, nepolar: alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, fenilalanina, triptofanul, metionina;

b. aminoacizi cu R polar, dar fără sarcină electrică: serina, treonina, tirozina, cisteina, asparagina, glutamina şi glicocolul (R = H);

c. aminoacizi cu R încărcat (-) (la pH-ul fiziologic): acidul aspartic, acidul glutamic;

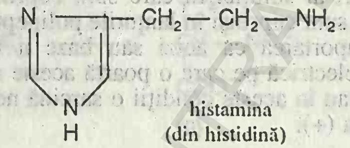
d. aminoaocizi cu R încărcat (+) (la pH-ul fiziologic): lizina, arginina, histidina.

Reacţiile chimice ale aminoacizilor. Aminoacizii prezintă diverse reacţii chimice la care participă atât funcţiile amino şi carboxil comune tuturor aminoacizilor, cât şi grupările prezente în radicalii de la C_α.

Reacţii ale grupării -COOH. Aminoacizii formează derivaţi normali ai acestei funcţii: esteri, amide, anhidride, nitrili. Prin decarboxilare, aminoacizii formează amine, multe dintre ele substanţe cu proprietăţi fiziologice şi farmacologice remarcabile (amine biogene):

$$R-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \longrightarrow R-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Unele amine, produşi ai reacţiei de decarboxilare a aminoacizilor, sunt arătaţi mai jos:



histamina (din histidină)

$HOOC-(CH_2)_3-NH_2$

acid γ-aminobutiric (din acid glutamic)

$\underset{OH}{\underset{|}{CH_2}}-CH_2-NH_2$

etanolamina (din serină)

$H_2N-(CH_2)_5-NH_2$

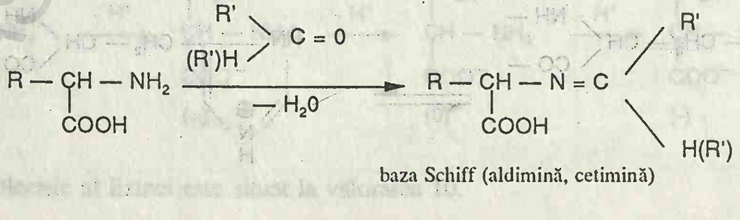
cadaverina (din lizină)

$\underset{SH}{\underset{|}{CH_2}}-CH_2-NH_2$

cisteamină (din cisteină)

Reacţii ale grupării $-NH_2$. Prin această funcţie aminoacizii dau numeroase reacţii:

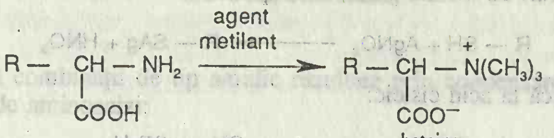
- condensare cu compuşi carbonilici:



baza Schiff (aldimină, cetimină)

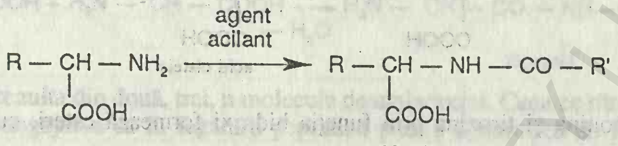
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- alchilare totală:



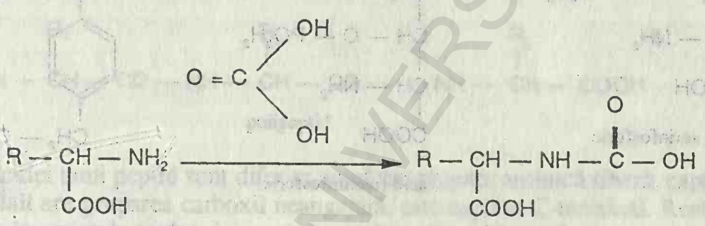
betaina

- acilare:

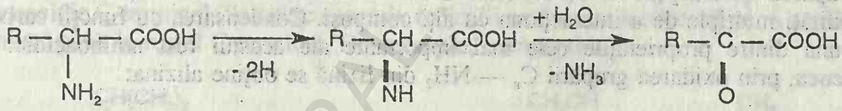


N-acil-derivat

Cu acidul carbonic, aminoacizii formează derivaţi carbaminoacizi:

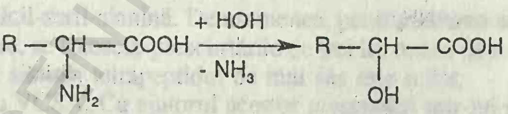


- oxidare:



α-cetoacid (α-oxoacid)

- înlocuirea grupării — NH_2 cu — OH:

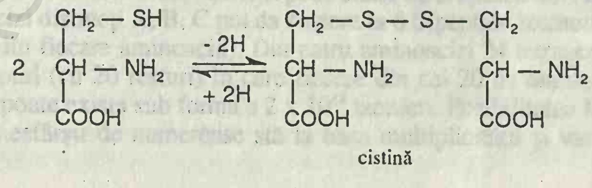


α-hidroxi-acid

Reacţii ale funcţiilor prezente în radicalul de la C_α.

Pentru funcţia tioalcool din cisteină sunt caracteristice reacţiile:

- oxidare blândă şi reversibilă la disulfură:



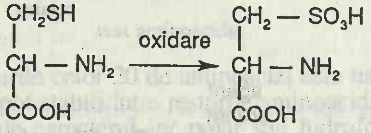
cistină

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- formare de săruri cu metale grele, marcaptide:

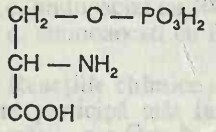
$$R - SH + AgNO_3 \longrightarrow R - SAg + HNO_3$$

- oxidare energică la acid cisteic:

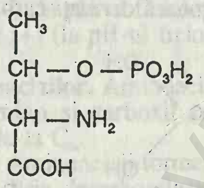


acid cisteic

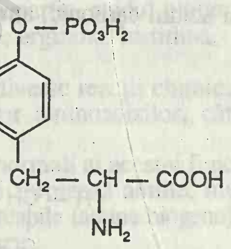
Serina, treonina şi tirozina prin funcţia hidroxi formează esteri, cu acidul fosforic, rezultând:



acid serinfosforic

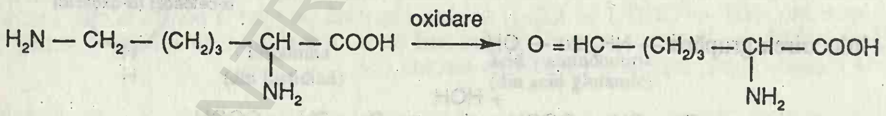


acid treoninfosforic



acid tirozinfosforic

Gruparea — NH_2 de la C_ε al lizinei conferă acestui aminoacid sau restului lizil, posibilităţi multiple de a interacţiona cu alţi compuşi. Condensarea cu funcţii carbonil este una dintre proprietăţile cele mai importante ale acestui rest aminoacidic. De asemenea, prin oxidarea grupării C_ε — NH_2 din lizină se obţine alizina:



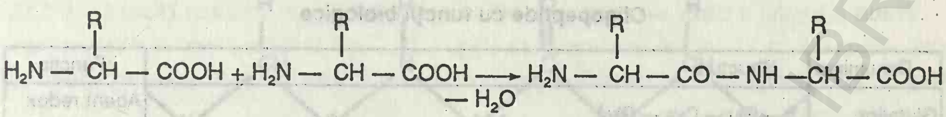
lizină alizină

Gruparea carbonil nou formată poate participa mai departe la alte reacţii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I.2 PEPTIDELE

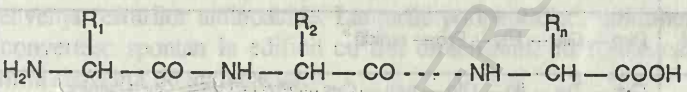
Peptidele sunt combinaţii de tip amidic rezultate prin condensarea a două sau mai multe molecule de aminoacizi:



dipeptid

Peptidele pot rezulta din două, trei, n molecule de aminoacizi. Ceea ce rămâne dintr-un aminoacid după angajarea sa în legătura peptidică poartă denumirea de rest (reziduu) aminoacidic.

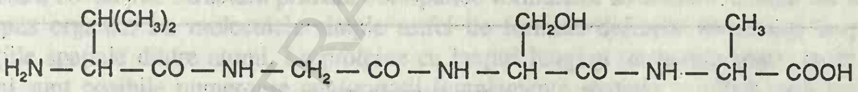
Peptidele cuprinzând mai puţine resturi aminoacide sunt denumite oligopeptide, iar acelea cu un număr mai mare de resturi aminoacidice sunt polipeptide:



polipeptid

Capetele moleculei unui peptid sunt diferite, unul are grupare aminică liberă, capăt N-terminal, iar celălalt are gruparea carboxil neangajată, este capătul C-terminal. Resturile de aminoacizi de la capetele moleculei sunt denumite resturi N-terminale şi, respectiv, C-terminale. Începutul unui peptid este capătul N-terminal.

Denumirile peptidelor se construiesc socotindu-le derivaţi acilaţi ai restului aminoacidic C-terminal. Se citesc succesiv radicalii aminoacizilor începând cu capătul N-terminal până la restul C-terminal. De exemplu, tetrapeptidul:



Se citeşte valil-glicil-seril-alanină. De asemenea, pentru redarea structurii unui peptid, mai mic sau mai mare, se folosesc prescurtările de trei litere sau de o singură literă pentru aminoacizi. În acest sistem, tetrapeptidul de mai sus este redat:
Val-Gly-Ser-Ala sau VCSA. Cu ajutorul acestor prescurtări într-un spaţiu restrâns pot fi redate structurile unor polipeptide foarte mari.

Datorită posibilităţii de legare a aceloraşi aminoacizi în secvenţe diferite, peptidele pot prezenta fenomenul de izomerie de structură, de poziţie. Doi aminoacizi diferiţi pot da naştere la două dipeptide izomere după cum unul sau altul ocupă poziţia N- sau C-terminală. De exemplu, dipeptidele izomere leucil-metionină sau metionil-leucină. Posibilităţile de izomerie cresc foarte repede odată cu creşterea numărului de aminoacizi. Trei aminoacizi distincţi A, B, C pot da naştere la 6 tripeptide izomere (peptidul cuprinde câte un rest din fiecare aminoacid). Din patru aminoacizi 24 tetrapeptide, din cinci 120. Un eicosapeptid (cu 20 resturi) în care fiecare din cei 20 de aminoacizi este cuprins o singură dată poate exista sub forma a 2×10^{18} izomeri. Posibilitatea legării aminoacizilor în secvenţe nesfârşit de numeroase stă la baza multiplicităţii şi varietăţii moleculare a proteinelor.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

În organismele vii se întâlnesc numeroase peptide (oligopeptide sau peptide mai mari) cu funcţii particulare. Unele din aceste peptide au legături peptidice atipice, cuprinzând resturi aminoacidice modificate, au structuri ciclice, cuprind D-aminoacizi (Tabelul I.5).

Tabelul I.5.

Oligopeptide cu funcţii biologice

Denumirea	Structura	Funcţia
Glutation	γ — Glu — Cys — Gly [a]	Agent redox intracelular
Bradikinina	Arg — Pro — Pro — Gly — Phe — Ser — Pro — Phe — Arg	Agent hipotensiv
Angiotensina II	Asp — Arg — Val — Tyr — Ile — His — Pro — Phe	Agent hipertensiv, reglează secreţia de aldosteron
TSH — RH	Piro — Glu — His — Pro — amidă [b]	Hormon hipotalamic
Oxitocină	Cys — Tyr — Ile — Gln — Asn — Cys — Pro — Leu — Gly — amidă [c] (S — S între Cys şi Cys)	Hormon neurohipofizar
Vasopresina	[c] Cys — Tyr — Phe — Gln — Asn — Cys — Pro — Leu(Arg) — Gly — amidă (S — S între Cys şi Cys)	Hormon neurohipofizar

a) Restul Gly N-terminal este angajat în legătură peptidică prin gruparea γ-COOH.
b) Restul Gly N-terminal formează amidă internă; restul Pro C-terminal formează amidă.
c) Resturile ^{1}Cys şi ^{6}Cys formează punte disulfurică; restul Gly C-terminal formează amidă.

I.3 PROTEINELE

Proteinele au o structură polipeptidică. Graniţa dintre polipeptidele propriu-zise şi proteine este arbitrară. La un anumit grad de complexitate a lanţurilor polipeptidice apar nivele superioare de organizare şi calităţi noi neîntîlnite la polipeptidele mai mici.

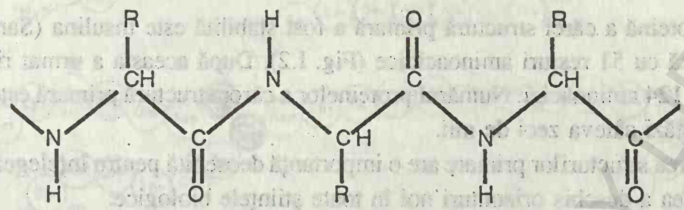
Proteinele, alături de acizii nucleici, sunt macromolecule ce există într-o varietate foarte mare. Fiecare tip de celulă, fiecare individ, fiecare specie posedă un set distinct de proteine. Se estimează că numărul de tipuri de proteine din întreaga lume vie este de 10^{10} — 10^{12} şi potenţialul de diversitate nu este epuizat. Chiar proteinele care îndeplinesc funcţii similare la specii diferite sunt entităţi distincte, cu mase şi proprietăţi diferite.

Chimia proteinelor este deosebit de complexă, ea presupune, mai întîi, înţelegerea principiilor generale de construcţie a moleculelor proteice, a modului în care dintr-un număr limitat de unităţi structurale se pot forma infinit de multe proteine şi a factorilor care intervin în realizarea organizării lor spaţiale. În al doilea rînd, studiul proteinelor

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

necesită abordarea fiecărui tip de proteină în parte, stabilirea pentru fiecare specie moleculară a constituţiei chimice, a arhitecturii şi a funcţiei (sau funcţiilor) pe care le exercită.

Structura polipeptidică este aptă să asigure proteinelor cele două caractere, diversitate moleculară, pe de o parte, şi specificitate de formă, pe de altă parte. Un polipeptid:



cuprinde o catenă principală cu o structură monotonă in care se repetă grupul de atomi - — NH — CH — CO —. Varietatea lanţurilor este asigurată de radicalii R legaţi la C_α. Cu ajutorul celor 20 radicali diferiţi se pot obţine combinaţii multiple, deosebite prin numărul şi secvenţa resturilor aminoacide. Lanţurile polipeptidice, unidimensionale şi flexibile, se convertesc spontan în edificii cu trei dimensiuni, cu forme caracteristice pentru o anumită secvenţă de aminoacizi.

Organizarea spaţială a lanţurilor polipeptidice are loc prin interacţiuni necovalente — legături de hidrogen, atracţii polare şi ionice, interacţiuni hidrofobe — la care participă atît grupările $>$ C = O şi $>$ NH din catena polipeptidică, cît şi diversele grupări cuprinse în catenele laterale ale lanţului.

Complexitatea proteinelor a făcut necesară introducerea mai multor trepte de organizare structurală denumite structură primară, secundară, terţiară şi structură cuaternară. Structura primară precizează numărul şi secvenţa resturilor aminoacidice din moleculă, ea redă totalitatea legăturilor covalente din moleculă şi mai este denumită şi structură covalentă. Structura primară corespunde formulelor structurale uzuale ale unui compus organic. La moleculele simple astfel de formule definesc în acelaşi timp şi relaţiile spaţiale dintre atomi. La proteine cu lanţuri lungi şi un număr foarte mare de atomi sunt posibile numeroase conformaţii (aranjamente spaţiale rezultate prin rotaţia liberă a atomilor sau grupurilor de atomi în jurul legăturilor simple) şi este necesară ierarhizarea nivelelor de organizare spaţială.

Structurile secundare rezultate din interacţiunile grupelor $>$ C = O şi $>$ NH din grupările peptidice, sunt structuri ordonate, periodice, elementul structural care le generează prezintă el însuşi regularitate. Structura terţiară a unui lanţ polipeptidic înglobează nivelul de organizare secundar la care se adaugă modul de pliere, împachetare a lanţului polipeptidic determinat de interacţiunile posibile între radicalii R de la C_α, interacţiuni ce depind atât de natura acestor radicali cât şi de relaţiile de vecinătate dintre ei. Descrierea organizării spaţiale a unui lanţ polipeptidic prin structură secundară şi terţiară este arbitrară, cele două nivele structurale se întrepătrund, împreună ele definesc conformaţia specifică a lanţului.

Proteinele alcătuite din mai multe lanţuri polipeptidice (proteine oligomere) cuprind un nivel cuaternar de organizare. Structura cuaternară a unei proteine oligomere descrie modul în care lanţurile polipeptidice individuale, se asociază, se asamblează pentru a realiza structura proteinei date, structura sa funcţională.

I.3.1 STRUCTURA PRIMARĂ A PROTEINELOR

Prima proteină a cărei structură primară a fost stabilită este insulina (Sanger, 1953), proteină mică cu 51 resturi aminoacidice (Fig. I.2). După aceasta a urmat ribonucleaza (Fig. I.3) cu 124 aminoacizi. Numărul proteinelor a căror structură primară este cunoscută depăşeşte astăzi câteva zeci de mii.

Cunoaşterea structurilor primare are o importanţă deosebită pentru înţelegerea rolurilor proteinelor, ea a deschis orizonturi noi în toate ştiinţele biologice:

a. Prin studii de secvenţializare s-a stabilit definitv că o proteină dată are o structură unică, nu este o colecţie de specii moleculare diferite (cum este cazul polimerilor de sinteză);

b. Structurile primare ale proteinelor constituie baza înţlegerii la nivel molecular a activităţii lor biologice;

c. Prin compararea structurilor primare a proteinelor care îndeplinesc funcţii omoloage la organisme diferite se poate stabili gradul de varietate structurală compatibilă cu o anumită funcţie şi aceste comparaţii permit urmărirea istoriei evolutive a proteinei. Două sau mai multe proteine omoloage pot varia la nivelul structurilor lor primare. Adesea aceste deosebiri rezultă prin înlocuirea unui aminoacid dintr-o grupă cu un altul aparţinând aceleiaşi grupe (de ex. Val cu Leu sau Arg cu Lys). Astfel de substituţii sunt denumite conservative. Înlocuirea unui aminoacid dintr-o anume poziţie cu altul aparţinând altei grupe (substituţie nonconservativă) poate altera într-o mare măsură funcţia proteinei;

d. Secvenţa aminoacizilor într-o proteină este veriga între mesajul genetic înscris în ADN şi expresia acestui mesaj;

e. Studiile de secvenţializare au dus la descoperirea unor specii de proteine anormale (proteine mutante) ca expresie a unor modificări la nivelul genomului; aceste proteine anormale se pot manifesta sub forma unor boli (boli moleculare).

f. Secvenţializarea unui număr din ce în ce mai mare de proteine a scos în evidenţă fenomenul de polimorfism molecular. O proteină cu o anumită funcţie, la o aceiaşi specie, poate exista sub forme moleculare diferite.

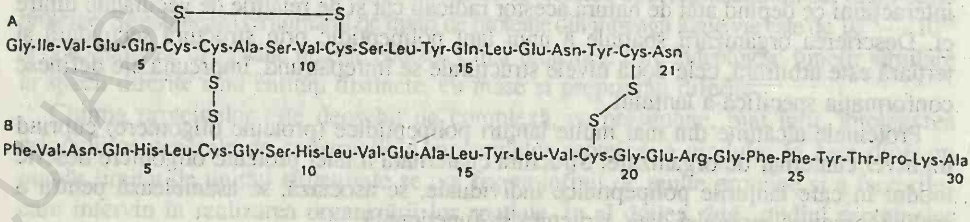


Fig. I.2 — Structura primară a insulinei

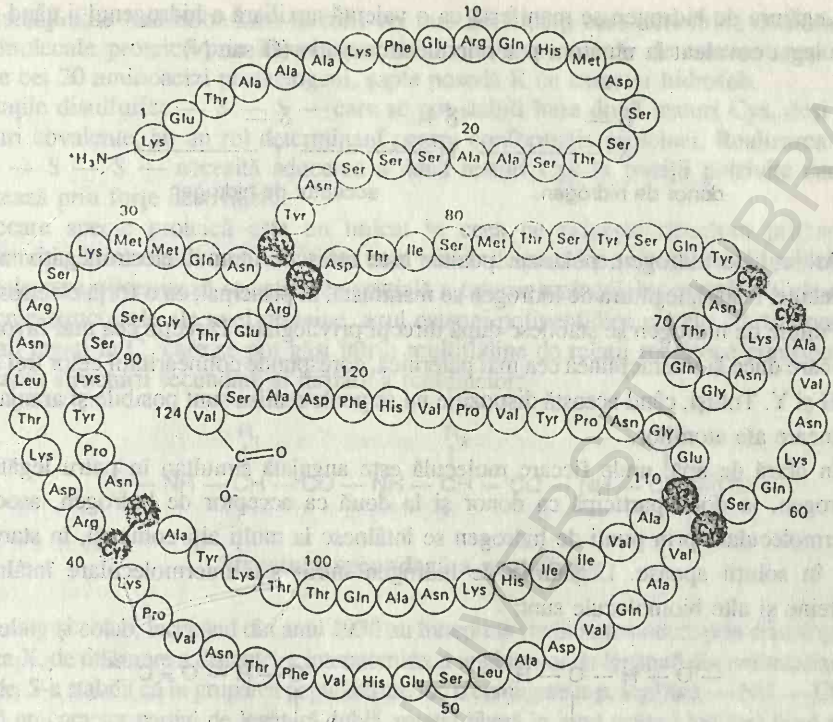


Fig. I.3 — Structua primară a ribonucleazei

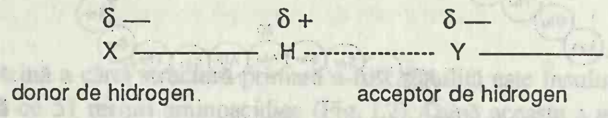
I.3.2. ORGANIZAREA SPAŢIALĂ A MOLECULELOR PROTEICE

Fiecare proteină, fiecare lanţ polipeptidic are o structură tridimensională specifică care este reprodusă cu fidelitate de milioane şi milioane de ori în cursul vieţii organismului şi de-a lungul generaţiilor. Forma specifică a unei molecule proteice este determinată de structura sa primară, unică pentru fiecare tip de proteină. Aranjamentul spaţial unic pe care un lanţ polipeptidic îl adoptă într-o soluţie este impus de constrângeri termodinamice, este rezultanta tuturor interacţiunilor necovalente care se pot stabili în cuprinsul moleculei astfel ca nivelul său energetic să fie minim. Aceste interacţiuni necovalente de energie joasă (1-7 kcal/mol sau 4-29 kJ/mol), au energii de activare mici, se stabilesc cu viteze foarte mari şi nu necesită intervenţia unor catalizatori. Ele devin eficiente numai prin însumarea efectelor unui număr foarte mare de legături.

Legăturile necovalente care se manifestă în cadrul moleculelor proteice, ca şi la alte categorii de biomolecule, sunt legăturile de hidrogen, legăturile polare şi interacţiunile hidrofobe.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

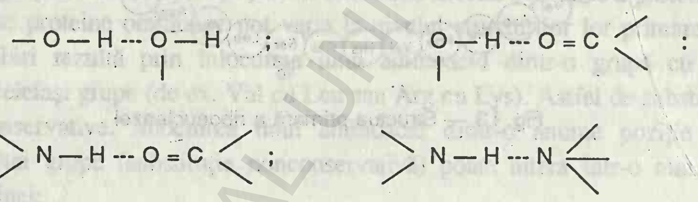
Legătura de hidrogen se manifestă ca o valenţă auxiliară a hidrogenului când acesta este legat covalent la un atom puternic electronegativ (O sau N):



Atomul de hidrogen, polarizat pozitiv este atras de atomul electronegativ al altei molecule. Astfel, legătura de hidrogen se manifestă, în principal, ca o forţă electrostatică.

Punţile de hidrogen se stabilesc după direcţii privilegiate. Direcţia cea mai favorabilă, cea care duce la interacţiunea cea mai puternică, corespunde colinearităţii celor trei atomi: X, H şi Y. Totuşi, când această dispoziţie nu se poate realiza sunt posibile şi aranjamente nelineare ale atomilor.

În afară de apă, unde fiecare moleculă este angajată simultan în patru legături de hidrogen, la două participă ca donor şi la două ca acceptor de hidrogen, asociaţiile intermoleculare prin punţi de hidrogen se întâlnesc la mulţi alţi compuşi, în stare pură sau în soluţii apoase. Legăturile de hidrogen intra- sau intermoleculare întâlnite la proteine şi alte biomolecule sunt:



Interacţiunile electrostatice, polare, se stabilesc între grupări cu sarcini electrice opuse. Aceste interacţiuni pot fi:

- asociaţii între perechi de ioni, legături saline (de ex. între un rest Arg şi unul Glu);
- interacţiunea dintre o grupare cu sarcină + sau cu o grupare polară fără sarcină;
- interacţiuni între grupări polare fără sarcină.

Proteinele cuprind un număr mare de aminoacizi cu R polar, fără sarcină, şi interacţiunile dintre aceştia sunt un factor important pentru stabilizarea structurilor de ordin superior ale proteinelor. Totodată, în interiorul moleculei proteice, unde accesul apei este interzis, se realizează un mediu dielectric, care favorizează interacţiunile polare.

Interacţiunile hidrofobe sunt acele forţe care fac ca moleculele sau grupările nepolare să se asocieze în agregarte şi să reducă la minimum contactul lor cu apa. Acest fenomen este datorat, în primul rând,, factorilor entropici; entropia apei scade când o moleculă nepolară vine în contact cu apa şi, respectiv, entropia apei creşte dacă această moleculă este exclusă din apă.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interacţiunile hidrofobe sunt factorii cei mai importanţi care determină conformaţia unei molecule proteice prin însumarea unui foarte mare număr de contacte nepolare. Dintre cei 20 aminoacizi proteinogeni, şapte posedă R cu caracter hidrofob.

Punţile disulfurice — S — S — care se pot stabili între două resturi Cys, deşi sunt legături covalente, au un rol determinant pentru conformaţia proteinei. Realizarea unei punţi — S — S — necesită aducerea a două resturi Cys în poziţii potrivite care se realizează prin forţe necovalente.

Fiecare specie proteică este un unicat în ceea ce priveşte structura primară şi conformaţia. Din studiul conformaţiilor unui număr de proteine se pot formula principiile generale care guvernează organizarea spaţială a tuturor moleculelor proteice. Cele două elemente structurale ale unei proteine, axul catenei polipeptidice şi cele 20 de tipuri de radicali legaţi la C_α care se pot găsi într-o multitudine de relaţii reciproce contribuie la realizarea structurii secundare şi terţiare a proteinelor:

$$-NH-\underset{}{\overset{R_1}{\overset{|}{CH}}}-CO-NH-\overset{R_2}{\overset{|}{CH}}-CO-NH-\overset{R_3}{\overset{|}{CH}}-CO-$$

Structura secundară a proteinelor

Pauling şi colab. începând din anul 1930 au întreprins studii sistematice, prin cristalografie cu raze X, de măsurare a distanţelor interatomice, a unghiurilor de legătură din aminoacizi, din peptide. S-a stabilit că în gruparea peptidică are loc o conjugare π-p, legătura — NH — CO — capătă un caracter parţial de legătură dublă, rotaţia liberă în jurul acestei legături fiind astfel împiedicată. Atomii C_α vor adopta poziţii rigide faţă de planul legăturii duble. În peptidele naturale se întâlneşte numai configuraţia trans, mai stabilă decât aceea cis (Fig. I.4).

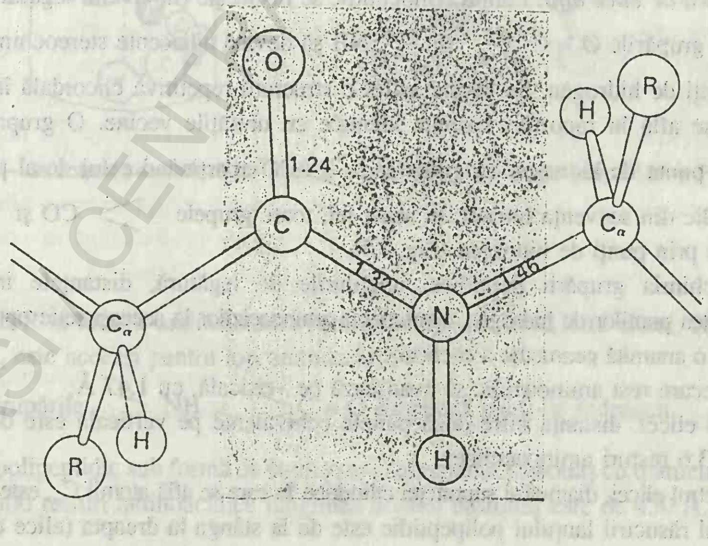


Fig. I.4 — Configuraţia trans a unei legături peptidice

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lanţul peptidic îşi păstrează flexibilitatea prin rotaţia liberă în jurul legăturilor:

$$\begin{array}{c} R_1 \\ | \\ —CH—NH— \end{array} \quad \text{şi} \quad \begin{array}{c} O \quad R_2 \\ \| \quad | \\ —C—CH— \end{array}$$

O altă însuşire a grupării peptidice este capacitatea grupei $>NH$ de a forma o legătură de hidrogen cu un grup $>C=O$ aparţinând altei grupări peptidice:

$$>N—H \cdots O=C<$$

Conjugarea π — p a grupării peptidice accentuează această însuşire.

Un lanţ polipeptidic, în soluţie, ar putea adopta o infinitate de conformaţii prin rotaţii în jurul legăturilor — $CH(R_1)$ — $N<$ şi — $CH(R_2)$ — CO— . Unele din aceste conformaţii vor fi mai stabile dacă permit realizarea de punţi de hidrogen între grupările peptidice. Plecând de la principiul că aranjamentul cel mai stabil este acela în care se realizează cel mai mare număr de punţi de hidrogen, Pauling şi Corey (1951) au postulat două structuri secundare pentru lanţurile polipeptidice α - elicea şi structura β. O structură elicoidală, distinctă de cea descrisă de Pauling, este întâlnită la colagen, proteina majoră a matricei extracelulare, care are o compoziţie aminoacidică particulară.

Structura de elice alfa. Lanţul polipeptidic se răsuceşte (la nivelul legăturilor simple) pentru ca grupările $O=C<$ şi $>NH$ să devină adiacente stereochimic pentru a forma punţi de hidrogen. Se obţine astfel o structură repetitivă elicoidală în care toate unităţile se află în raporturi spaţiale identice cu unităţile vecine. O grupare $>NH$ formează punte de hidrogen cu gruparea $>CO$ aparţinând celui de-al patrulea rest aminoacidic din secvenţa lineară. În acest fel, toate grupele $>CO$ şi $>NH$ sunt unite prin punţi de hidrogen (Fig. I.5).

Stereochimia grupării peptidice, unghiurile de legătură, distanţele interatomice, colinearitatea punţilor de hidrogen, apartenenţa aminoacizilor la aceeaşi serie optică (seria L) determină o anumită geometrie a α-elicei:

- cu fiecare rest aminoacidic se avansează pe verticală, cu 1,47 Å;
- pasul elicei, distanţa între două puncte echivalente pe verticală este de 5,21 Å şi cuprinde 3,6 resturi aminoacidice;
- diametrul elicei, diametrul suprafeţei cilindrice în care se află atomii C_α, este de 10,1 Å;
- sensul răsucirii lanţului polipeptidic este de la stânga la dreapta (elice dreaptă);

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

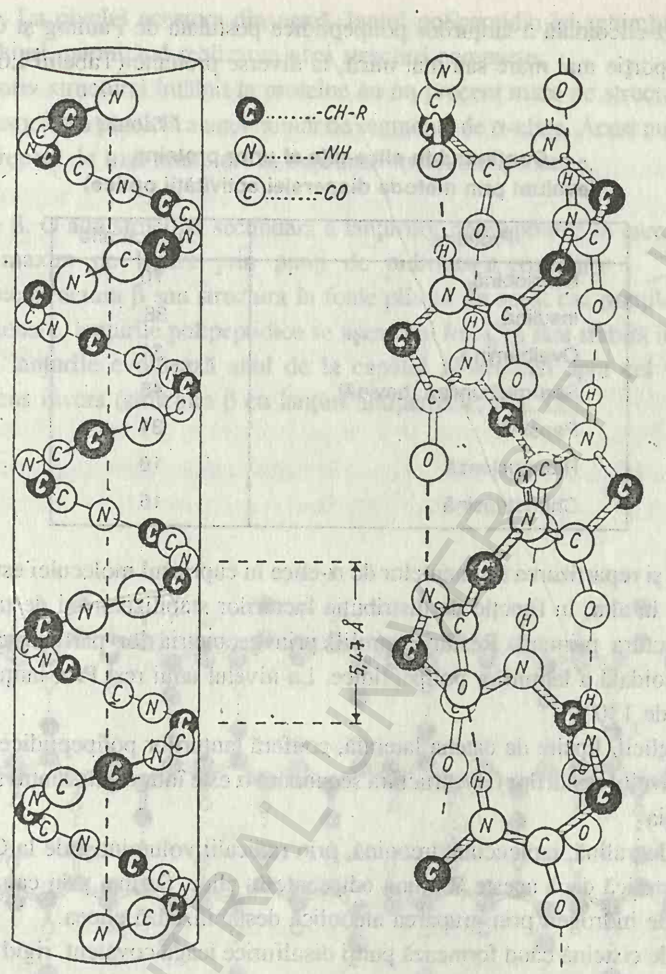


Fig. I.5 — Structura secundară de α-elice a unui lanţ polipeptidic (după Linus Pauling)

- radicalii R ai tuturor aminoacizilor sunt orientaţi spre exteriorul elicei, configuraţia atomilor C_α este aceeaşi pentru toţi aminoacizii;

- toate grupările $>$NH şi $>$C = O formează punţi de hidrogen.

Un lanţ polipeptidic sub formă de α-elice are forma unui bastonaş cu diametrul de 10,1 Å. Pentru 300 resturi aminoacidice lungimea acestui bastonaş este de 450 Å.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura α-elicoidală a lanţurilor polipeptidice postulată de Pauling şi Corey a fost găsită, în proporţie mai mare sau mai mică, la diverse proteine (Tabelul I.6).

Tabelul I.6

Conţinutul în elice-alfa al unor proteine (evaluat prin metoda dispersiei activităţii optice)

Proteina	% elice alfa
Mioglobină	70
Insulină	38
Ovalbumină	31
Serumalbumină (bovină)	46
Pepsină	31
Ribonuclează	16
Chimotripsină	15

Lungimea şi repartizarea segmentelor de α-elice în cuprinsul moleculei este diferită de la o proteină la alta, în funcţie de distribuţia factorilor stabilizatori şi destabilizatori ai elicei în structura primară. Resturile prolil, prin geometria lor particulară, împiedică răsucirea elicoidală a lanţurilor polipeptidice. La nivelul unui rest Pro, lanţul se îndoaie cu un unghi de 130°.

Resturile glicil, lipsite de catena laterală, conferă lanţurilor polipeptidice flexibilitate şi adesea la nivelul resturilor Gly structura secundară α este întreruptă, lanţul schimbându-şi uşor direcţia.

Resturile de valină, izoleucină, treonină, prin radicalii voluminoşi de la C_β determină o stânjenire sterică dacă aceste R ajung adiacente în elice. Serina, prin capacitatea de a forma punţi de hidrogen prin gruparea alcoolică destabilizează elicea.

Resturile de cisteină când formează punţi disulfurice leagă covalent, rigid, porţiuni ale lanţului polipeptidic şi în vecinătatea acestor regiuni răsucirea elicoidală nu mai poate avea loc.

Structura secundară α se întâlneşte în diverse proporţii atât la proteine fibrilare cât şi la proteine globulare. O proteină fibrilară cu structură secundară α în proporţie de aproape 100% este keratina, proteină abundentă în păr, piele, unghii. Este alcătuită din lanţuri polipeptidice lungi, cu structură de α-elice, asociate câte două şi superîncolăcite. Prin asocierea acestor dimeri se realizează fibrile şi fibre rezistente. În aceste fibrile, grupările R pot interacţiona prin valenţe secundare în cele mai bune condiţiuni. În plus, structura superelicoidală este stabilizată şi prin punţi disulfurice intercatenare, keratina având un conţinut ridicat în cisteină.

Mioglobina şi hemoglobina au un procent mare (70 %) de structură secundară α. În aceste cazuri, segmentele de α-elice sunt scurte, ele sunt întrerupte de porţiuni

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

neelicoidale. La nivelul acestora din urmă, lanţul polipeptidic îşi schimbă direcţia sub diverse unghiuri, permiţând realizarea unei structuri compacte.

Un alt motiv structural întâlnit la proteine cu un procent mare de structură secundară α constă în asocierea paralelă a unui număr de segmente de α-elice. Acest motiv structural putându-se repeta de mai multe ori în cuprinsul moleculei proteice.

Structura β. O altă structură secundară a lanţurilor polipeptidice în care se realizează potenţialul maxim de legare prin punţi de hidrogen a grupărilor >C = O şi >NH este structura β sau structura în foaie plisată. În acest caz punţile de hidrogen sunt intercatenare, lanţurile polipeptidice se aşează în foi. Cea mai stabilă interacţiune se obţine dacă lanţurile evoluează unul de la capătul N-terminal spre cel C-terminal şi celălalt în sens invers (structura β cu lanţuri antiparalele; Fig. I.6).

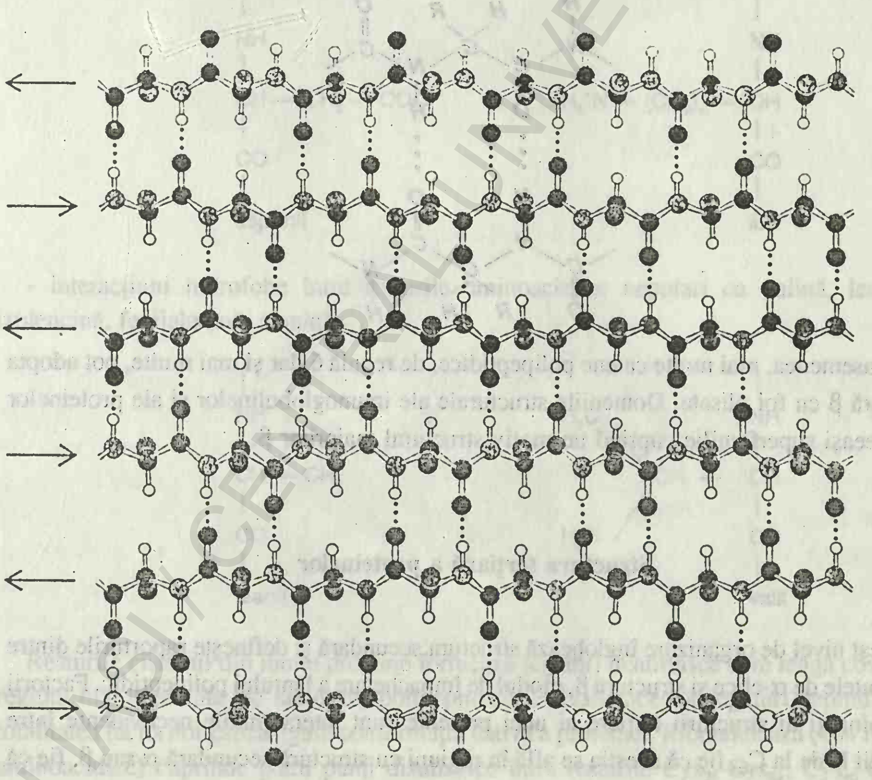


Fig. I.6 — Structura secundară β cu lanţuri polipeptidice antiparalele

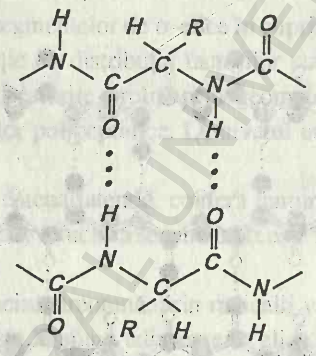
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Datorită rigidităţii legăturii peptidice şi coplanarităţii grupului

— CH — NH — CO — CH — se realizează structuri asemănătoare unei foi plisate. Radicalii R sunt orientaţi, alternativ, de o parte şi de alta.

Structura secundară β în foaie plisată este întâlnită în proporţie de aproape 100 % în proteina din mătase, fibroina. Lanţurile polipeptidice antiparalele sunt întinse şi asociate prin legături de hidrogen, dând naştere unei foi plisate. Aceste foi se aşează în straturi, între straturi se stabilesc numeroase legături între grupările R, care proeminează de o parte şi de alta a fiecărei foi. Datorită unei structuri primare speciale, cu multe resturi Gly şi Ala alternante, distanţele dintre foi sunt mici (3,5 Å şi 5,7 Å alternativ). Această structură conferă fibroinei rezistenţă la întindere şi flexibilitate.

Structurile β sunt motive structurale întâlnite frecvent în proteine globulare. Cel mai simplu element de structură β constă dintr-un lanţ polipeptidic îndoit asupra lui însuşi care realizează două segmente antiparalele, denumit β-turn:



De asemenea, mai multe catene polipeptidice, de regulă 6 dar şi mai multe, pot adopta structură β cu foi plisate. Domeniile structurale ale imunoglobulinelor şi ale proteinelor din aceeaşi superfamilie cuprind un motiv structural majoritar β.

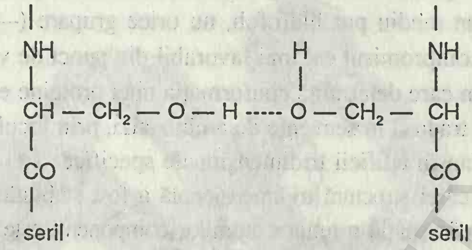
Structura terţiară a proteinelor

Acest nivel de organizare înglobează structura secundară şi defineşte raporturile dintre segmentele de α-elice şi structura β, modul de împachetare a lanţului polipeptidic. Factorii determinanţi ai structurii terţiare ai unei proteine sunt interacţiunile necovalente între radicalii R de la C_α, fie că aceştia se află în regiuni cu structură secundară α sau β, fie că sunt cuprinşi în segmente neorganizate. La nivelul de organizare terţiar molecula proteică dobândeşte forma sa specifică.

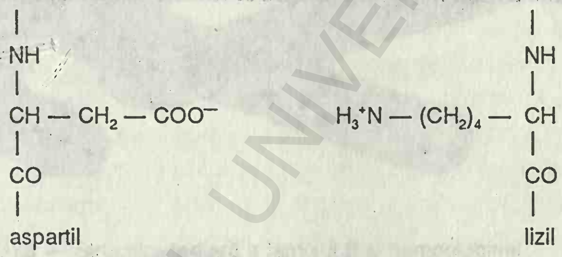
BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Între diverşii radicali ai aminoacizilor se pot stabili următoarele tipuri de legături necovalente:

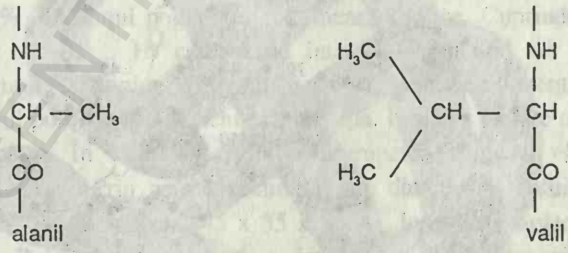
- punţi de hidrogen între radicalii cu grupări alcoolice (din resturi seril, treonil), fenolice (din resturi tirozil), amidice (din resturi glutaminil şi asparaginil):



- legături ionice, saline, între radicalii cu sarcină negativă (din resturi lizil, arginil, histidil) sau interacţiuni polare între radicalii polari, fără sarcini:



- interacţiuni hidrofobe între resturile aminoacizilor nepolari ca valină, leucină, izoleucină, fenilalanină, alanină:



Resturile cisteinil din multe proteine formează legături disulfurice care leagă covalent regiuni mai depărtate ale lanţurilor polipeptidice. Poziţiile acestor legături depind şi de totalitatea factorilor care asigură conformaţia nativă a proteinei. Ribonucleaza (104 resturi aminoacidice) cuprinde patru punţi disulfurice între resturile Cys_{26}-Cys_{84}, Cys_{40}-Cys_{95}, Cys_{58}-Cys_{110} şi Cys_{65}-Cys_{72}. Din multitudinea de combinaţii posibile, între cele 8 resturi cisteinil, în proteina nativă se realizează una singură (Fig.I.3).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un lanţ polipeptidic adoptă, în măsura în care îi permite structura sa primară, configuraţii de α-elice şi de structură β şi prin pliere, împachetarea lanţului caută să satisfacă şi afinităţile radicalilor R. Rezultanta tuturor acestor interacţiuni determină conformaţia moleculei proteice. Această conformaţie este de fapt un compromis — nu se pot realiza toate legăturile de hidrogen posibile, nu toate porţiunile nepolare ajung să fie înconjurate de un mediu pur hidrofob, nu orice grupare (—) ajunge la vecinătatea uneia (+), dar este compromisul cel mai favorabil din punct de vedere energetic, cel mai stabil. Factorul ultim care determină conformaţia unei proteine este structura sa primară. Informaţia genetică tradusă în secvenţe de aminoacizi, prin jocul forţelor fizico-chimice, se transformă spontan în edificii tridimensionale specifice.

Prima proteină a cărei structură tridimensională a fost stabilită în cele mai mici detalii, precizându-se poziţia în spaţiu a tuturor atomilor componenţi este mioglobina (Kendrew şi colab., 1957). Mioglobina este o proteină abundentă în muşchi, în special la mamiferele cufundătoare (balenă, caşalot) având rolul de rezervor tisular de oxigen. Este o proteină cuprinzând aproximativ 150 aminoacizi (mioglobina din muşchiul de caşalot 153) şi o grupare neproteică denumită hem. În Fig. I.7. se arată schematic conformaţia moleculei de mioglobină.

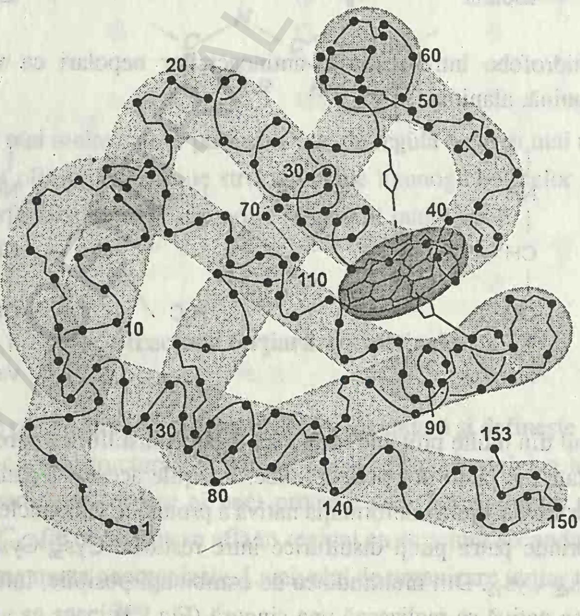


Fig. I.7 — Structura terţiară a mioglobinei

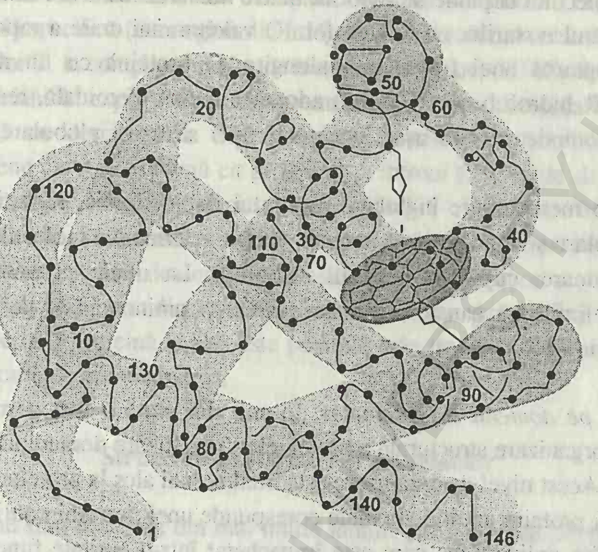


Fig. I.8 — Structura terţiară a lanţului β al hemoglobinei

În mioglobină 75% din lanţul polipeptidic formează α-elice. Cuprinde 8 segmente elicoidale (denumite A, B, ... H) cuprinzând între 7 (segmentul D) şi 24 resturi aminoacidice (segmentul H). Regiunile elicoidale sunt separate de segmente neelicoidale la nivelul cărora lanţul polipeptidic îşi schimbă direcţia. În patru puncte de terminare a elicelor se află prolina. În celelalte regiuni întreruperea răsucirii elicoidale este determinată de alţi factori. Prin aceste schimbări ale direcţiei lanţului polipeptidic, molecula devine extrem de compactă (45 x 35 x 25 Å). Interiorul moleculei cuprinde numai aminoacizi cu R nepolar, cu excepţia a două resturi histidil angajate în legarea grupării hem. Resturile treonil şi tirozil au grupările hidroxilice orientate superficial, pe când porţiunile nepolare ale acestor aminoacizi sunt îngropate în interior. Suprafaţa externă a moleculei cuprinde toate resturile polare şi cu sarcină electrică, presărate printre radicali nepolari.

Conformaţia lanţurilor polipeptidice din hemoglobină este asemănătoare cu cea a mioglobinei (Perutz, 1959) (Fig.I.8).

În prezent, sunt cunoscute structurile terţiare ale multor proteine. Proteinele solubile, citoplasmatice sau acelea prezente în plasmă sau în lichidele interstiţiale sunt proteine globulare care au etalate pe suprafaţă grupările polare şi pe acelea care pooartă sarcini electrice. Radicalii nepolari sunt orientaţi în interiorul moleculei. Forma sferică sau elipsoidală a moleculei depinde de raportul dintre numărul resturilor aminoacidice cu R încărcat şi numărul resturilor cu R hidrofob. O valoare mai mare a raportului (0,9-1,4) favorizează adoptarea unei forme mai alungite. O proteină cu un raport număr R încărcat/număr R hidrofob mic (0,3-0,6) adoptă o formă sferoidală, resturile nepolare, hidrofobe se acomodează mai uşor în centrul unei structuri globulare decât al uneia cilindrice.

La proteinele membranare înglobate în stratul dublu lipidic, repartizarea resturilor aminoacidice polare şi nepolare este inversă. Partea exterioară a moleculei, în contact cu lipidele membranare, cuprinde radicalii hidrofobi. La unele proteine, în interiorul moleculei se delimitează canale căptuşite cu resturi aminoacidice polare şi încărcate electric (canale ionice).

Organizarea pe domenii a proteinelor. În anii din urmă a fost descris un alt nivel intermediar de organizare structurală a proteinelor, organizare domenială sau suprastructură secundară. Acest nivel de organizare este întâlnit mai ales la proteinele mai mari. Un domeniu al unei proteine multidomeniale corespunde unei porţiuni continue în structura primară a lanţului polipeptidic care este împachetat într-o entitate funcţională şi are o organizare proprie secundară şi terţiară. Domeniile sunt separate între ele prin porţiuni de lanţ mai puţin organizat, flexibil, ceea ce asigură posibilitatea deplasării unui domeniu în raport cu altul (dinamica domeniilor). Relaţiile dintre domenii sunt deosebit de variate, zonele de contact, de interacţiune pot fi mai reduse sau mai întinse. De asemenea, dimensiunile domeniilor structurale variază între limite largi, de la câteva zeci de resturi aminoacidice, la sute (cel mult 400).

Organizarea domenială a proteinelor se întâlneşte la multe proteine şi domeniile structurale s-au dovedit a fi unităţi fundamentale ale evoluţiei şi diversificării proteinelor. Prin compararea unor proteine analoage (exercită funcţii similare) sau/şi omoloage (derivă dintr-un acelaşi strămoş) s-a găsit că aceste proteine cuprind unul sau mai multe domenii structurale aproape identice. Acest fapt denotă că odată ce prin procesul de evoluţie s-a „inventat" o proteină aptă să îndeplinească optim o anumită funcţie, patternul structural al acesteia a fost conservat şi repetat ori de câte ori a fost necesar. Diversificarea şi complexificarea proteinelor s-a făcut prin combinări ale acestor motive structurale.

În natură există numeroase enzime, diverse ca origine şi activitate catalitică, care utilizează ca substrat un nucleotid (ca NAD, FAD, AMP). Toate aceste enzime cuprind un domeniu structural de aproximativ 70 resturi aminoacidice cu o regiune specifică de legare a nucleotidului.

Proteinele care reglează transcrierea ADN şi exprimarea informaţiei genetice au capacitatea de a se lega de ADN dublu elicoidal. În structura acestor proteine a fost recunoscută existenţa câtorva motive structurale (fermoar cu leucină, deget cu zinc, motiv αβα) care prin formă şi dimensiune sunt complementare cu adâncitura mare din dubla elice de ADN (12Å/7Å).

Imunoglobulinele sunt alcătuite din mai multe domenii structurale (12) care prezintă o organizare spaţială specifică (imunoglobulin fold). Acest domeniu structural este întâlnit şi la receptorul celulelor T, la complexul major de histocompatibilitate (HMC) clasa I şi clasa II.

Un pas important în explicarea şi interpretarea organizării domeniale a proteinelor a fost făcut odată cu descoperirea discontinuităţii genelor, a alcătuirii lor din exoni (segmente de gene care se exprimă ca proteine) şi introni (segmente de gene transcriptibile dar netraductibile, care nu se exprimă ca proteine). S-a constatat că, în multe cazuri, un domeniu structural proteic este codificat de un exon. Prezenţa unui aceluiaşi domeniu în proteine omoloage indică descendenţa acestor proteine dintr-un strămoş comun. De asemenea, unele domenii sunt dispersate în diverse proteine ale aceleiaşi specii. Trecerea unui domeniu de la o proteină la alta este posibilă prin trecerea unui exon dintr-o genă în alta, prin rearanjări cromosomiale.

Structura cuaternară a proteinelor

Multe proteine sunt alcătuite din mai multe lanţuri polipeptidice, de regulă un număr mic şi pereche (proteine oligomere) (Tabelul I.7). Lanţurile individuale sunt denumite protomeri sau subunităţi. La aceste proteine pe lângă structurile primară, secundară şi terţiară ale fiecărui protomer, apare un nivel superior de organizare — structura cuaternară. Aceasta defineşte natura, numărul şi modul de asociere a protomerilor.

Tabelul I.7

Proteine oligomere

Proteina	Masa proteinei Kdaltoni	Nr.protomeri	Masa protomerilor Kdaltoni
Miozină	468	2	212
Creatin kinază	80	2	40
Fosfatază alcalină	80	2	40
Hemoglobină	64,5	4	16
Lactat dehidrogenază	150	4	35
Aldolază	160	4	40
Glicogen fosforilază	270	4	92,5
Piruvat kinază	237	4	57,2
Ceruloplasmină	151	8	18
Glutamin sintetază	592	12	48,5

Funcţia specifică a unei proteine oligomere se manifestă numai la nivelul structurii cuaternare, protomerii separaţi sunt inactivi.

Asamblarea protomerilor, structura cuaternară, se realizează numai prin forțe slabe necovalente și asocierea devine stabilă, permanentă, numai dacă suprafețele de contact sunt complementare și un număr cât mai mare de atomi se apropie până la nivelul razelor lor van der Waals (raze de contact). Complementaritatea suprafețelor de contact asigură un grad foarte înalt de precizie și de specificitate a structurilor cuaternare. Protomerii unor proteine omoloage de la specii diferite nu se asociază.

Interacțiunile prin suprafețe complementare prezintă fenomenul de cooperare, primele interacțiuni favorizează formarea celorlalte. La început moleculele se juxtapun prin câteva puncte după care celelalte grupări își găsesc mai ușor partenerii.

Capacitatea de interacțiune a moleculelor prin suprafețe complementare explică nu numai formarea proteinelor oligomere, a unor structuri supramoleculare, dar și modul în care proteinele cu structură cuaternară își îndeplinesc funcțiile caracteristice, de transport etc.

Structurile cuaternare permit funcționarea unor mecanisme fine de reglare a activității proteinelor. O perturbație care are loc la nivelul unui protomer (de exemplu combinarea sa cu un compus oarecare), poate fi transmisă în restul moleculei, fiind resimțită la nivelul contactului dintre protomeri, structura cuaternară este alterată și totodată și funcția proteinei. Acest mecanism de reglare este denumit reglare alosterică, ce va fi dezvoltat în capitolul de enzime.

Hemoglobina este o proteină oligomeră. Hematiile normale cuprind mai multe specii moleculare de hemoglobină. Componenta principală din sângele adultului este hemoglobina A_1 (Hb A_1) alături de care se află în cantitate mică Hb A_2. La embrion există o Hb E iar la făt și nou-născut Hb F. Toate speciile de hemoglobină cuprind patru lanțuri polipeptidice de câte două tipuri. Hemoglobina A_1 are structura α_2 β_2.

Celelalte specii de hemoglobină cuprind în locul lanțurilor β, lanțuri γ. δ. ε :

$$\text{Hb } A_1 = \alpha_2\ \beta_2$$
$$\text{Hb } A_2 = \alpha_2\ \delta_2$$
$$\text{Hb F} = \alpha_2\ \gamma_2$$
$$\text{Hb E} = \alpha_2\ \varepsilon_2$$

Fiecare protomer este legat de câte o grupare hem și activitatea de transport a oxigenului se manifestă numai la nivelul tetramerului.

Lanțul α cuprinde 141 resturi aminoacidice, iar cel β, 146 resturi. Structurile terțiare ale acestor lanțuri sunt similare cu ale mioglobinei, cu care are similitudini și de compoziție aminoacidică. În Fig. I.9 este arătată structura cuaternară a hemoglobinei. Un lanț α este asociat de cele două lanțuri β prin zone de contact diferite α_1 β_1 și α_1 β_2. Contactele între protomeri identici α și α sunt foarte reduse. Contactul α_1 β_2 este cel mai întins în spațiu, sunt implicate 34 resturi aminoacidice și aduce în contact 110 atomi. Forța principală de legare sunt interacțiunile hidrofobe. Al doilea contact, α_1 β_1 mai restrâns aduce în vecinătate 80 atomi aparținând la 19 resturi aminoacidice. Datorită acestui contact mai slab, hemoglobina se disociază în condițiuni favorabile, mai întâi în dimeri și apoi sunt eliberați protomerii:

$$\alpha_2\ \beta_2 \rightleftharpoons 2\ \alpha\beta \rightleftharpoons 2\alpha + 2\beta$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

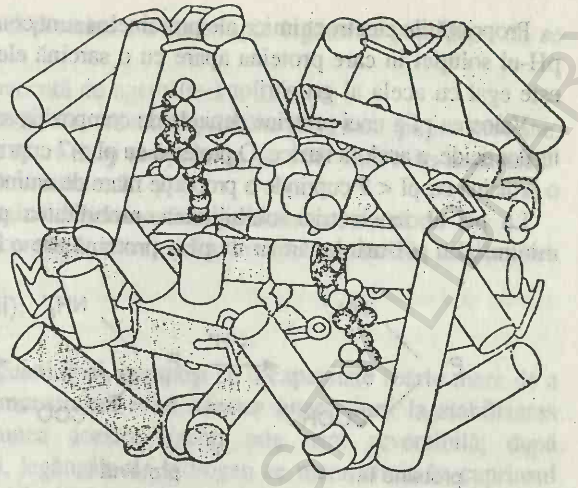


Fig. I.9 — Structura cuaternară a hemoglobinei. Regiunile elicoidale sunt reprezentate prin cilindri

I.3.3. PROPRIETĂŢI GENERALE ALE PROTEINELOR

Solubilitatea. Proteinele fibrilare sunt insolubile în apă, pe când cele globulare prezintă grade diferite de solubilitate. Această însuşire este datorată repartizării pe suprafaţa moleculelor de resturi aminoacidice cu sarcini electrice şi a acelora care cuprind grupări polare.

Solubilitatea în apă a proteinelor este puternic influenţată de pH-ul mediului prin modificarea încărcării electrice a proteinei. De asemenea, diverse săruri ale metalelor uşoare — NaCl, $MgCl_2$, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$ -, influenţează considerabil solubilitatea proteinelor. La concentraţii mici ele au un efect favorabil. De exemplu, proteinele din clasa globulinelor sunt greu solubile în apă pură, ele se dizolvă uşor numai în soluţii saline diluate. La concentraţii foarte mari, sărurile amintite scad solubilitatea proteinelor până la precipitarea lor din soluţii (salifiere). Albuminele şi globulinele se deosebesc după uşurinţa cu care sunt precipitate de către sulfatul de amoniu. Globulinele precipită când soluţiile care le cuprind sunt aproximativ semisaturate în $(NH_4)_2SO_4$, pe când albuminele precipită la concentraţii mai mari de 75% saturaţie. Precipitarea fracţionată a proteinelor din soluţie prin adăugarea treptată de $(NH_4)_2SO_4$ este o metodă cu largi utilizări pentru separarea proteinelor din medii biologice complexe.

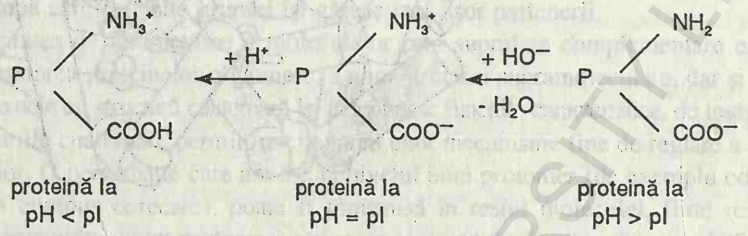
Proprietăţile electrochimice. Proteinele sunt amfoliţi macromoleculari, cuprind un număr mai mare sau mai mic de grupări acide şi bazice. Contribuţia cea mai importantă o au resturile glutamil, aspartil, lizil, arginil şi histidil. Resturile aminoacidice C-terminal şi N-terminal au o contribuţie redusă, cu atât mai redusă cu cât lanţul polipeptidic este mai lung. La pH-ul fiziologic toate aceste funcţii acide sau bazice sunt ionizate complet (restul histidil este ionizat aproximativ 50%), proteina apare ca un poliamfolit.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proprietăţile electrochimice ale proteinelor sunt concretizate prin pH-ul izoelectric (pI), pH-ul soluţiei în care proteina apare cu o sarcină electrică nulă, numărul grupărilor (+) este egal cu acela al grupărilor (—).

Valoarea pI a unei proteine depinde de compoziţia sa aminoacidică, de predominenţa resturilor acide, a acelora bazice. O proteină cu pI > 7 cuprinde un exces de lizină şi/sau arginină; o proteină cu pI < 7 cuprinde o proporţie mare de aminoacizi dicarboxilici (Tabelul I.8).

La pH-ul izoelectric solubilitatea, mobilitatea proteinei în câmpuri electrice este minimă. La pH-uri depărtate de pI o proteină are o încărcătură netă (+) sau (—):



Sub formă de anioni sau cationi, proteinele migrează în câmpuri electrice, proprietate care stă la baza metodelor electroforetice de separare a proteinelor din amestecuri.

Tabelul I.8.

pH-urile izoelectrice (pI) ale unor proteine

Proteina	pI
Salmină	12,10
Histonă	10,80
Serumalbumină	4,90
Miozină	5,20
Fibrinogen	5,50
Tireoglobulină	4,58
Lizozim	11,00
Mioglobină	6,99
Hemoglobină	7,07
Citocrom c	9,80
Insulină	5,35
Pepsină	~ 1,00

Denaturarea proteinelor. Conformaţiile native ale proteinelor globulare, rezultate prin împachetarea specifică a lanţurilor polipeptidice şi asocierea subunităţilor în proteinele oligomere sunt extrem de fragile, ele sunt uşor perturbate sub acţiunea unei multitudini de agenţi care afectează interacţiunile necovalente din cuprinsul moleculei. Modificarea conformaţiei native a unei proteine poartă denumirea de denaturare şi agenţii care o provoacă sunt agenţi denaturanţi. Structurile de ordin superior ale unei proteine — secundară, terţiară, cuaternară — sunt asigurate de legături necovalente de energie joasă şi agenţii denaturanţi pun în joc forţe de intensitate mică care nu afectează legăturile

covalente. În cursul denaturării unei proteine nu sunt rupte legăturile peptidice, nu se eliberează aminoacizi.

Denaturarea proteinelor este provocată de agenţi foarte diferiţi:

- temperatura de 50-60° denaturează cele mai multe proteine globulare; puţine proteine, de ex. ribonucleaza, suportă pentru scurt timp temperaturi de 100° fără a se denatura;
- radiaţiile cu frecvenţă mare, ultraviolete, X, γ ;
- pH-urile extreme, acide sau bazice denaturează majoritatea proteinelor;
- ureea şi guanidina, în concentraţii mari denaturează, reversibil, majoritatea proteinelor solubile;
- agenţii tensioactivi (surfactanţii);
- solvenţii organici.

Acţiunea denaturantă a ureei şi guanidinei, compuşi cu o capacitate foarte mare de a contracta legături de hidrogen, demonstrează rolul acestor interacţiuni la stabilizarea conformaţiei unei proteine. Acţiunea acestor agenţi este uşor reversibilă; după îndepărtarea ureei sau a guanidinei, legăturile de hidrogen se reconstituie în cuprinsul moleculei proteice în acelaşi număr şi în aceleaşi poziţii ca în proteina nativă. Denaturarea proteinelor sub acţiunea agenţilor tensioactivi sau a solvenţilor organici demonstrează rolul interacţiunilor hidrofobe în realizarea conformaţiei native a unei proteine. Acizii şi bazele modifică încărcarea electrică a unor gupări, schimbă raporturile de vecinătate între sarcinile + şi - de pe suprafaţa moleculei.

I.3.4. CLASIFICAREA PROTEINELOR

Sistematizarea proteinelor, compuşi de o varietate moleculară şi funcţională extraordinar de mare, este deosebit de grea, orice încercare este arbitrară bazându-se pe unele trăsături ale proteinelor şi ignorându-le pe altele.

O primă împărţire foarte generală a proteinelor este aceea în proteine globulare, uşor solubile şi în genere proteine intracelulare şi proteine fibrilare, insolubile, de regulă proteine extracelulare, cu roluri de susţinere.

Un alt criteriu de clasificare a proteinelor este prezenţa sau absenţa în moleculă a unei grupări chimice distincte de lanţul polipeptidic, denumită grupare prostetică. Pe această bază, proteinele sunt clasificate în proteine simple, alcătuite numai din aminoacizi şi proteine conjugate (heteroproteine), alcătuite dintr-o proteină (apoproteină) şi o grupare prostetică. După natura grupării prostetice se deosebesc următoarele clase de proteine:

Fosfoproteine, gruparea prostetică este constituită din restul fosforil ($-PO_3H_2$) legat esteric la grupări hidroxilice ale resturilor seril, treonil sau tirozil.

Unele proteine cuprind permanent resturi fosforil (de ex. cazeina), pe când altele oscilează între forme fosforilate şi defosforilate (proteine interconvertibile). Schimbarea gradului de fosforilare a unei proteine, face parte dintr-un mecanism general de reglare a funcţiilor proteinelor (vezi capitolele enzime, hormoni).

Glicoproteine, proteine ce cuprind unități monozaharidice sau oligozaharidice atașate de lanțul polipeptidic. Proteinele din membrana plasmatică, cele care căptușesc diverse cavități sunt bogate în resturi glucidice. Un număr redus de glucide este prezent însă în mai toate proteinele.

Lipoproteinele sunt asociații între proteine (apolipoproteine) și una sau mai multe grupe de lipide amfipatice. Asocierile predominant necovalente sunt totuși suficient de stabile și specifice, lipoproteinele existând ca entități structurale de sine stătătoare. În plasmă există mai multe grupe de lipoproteine (chilomicroni, α — și β — lipoproteine).

Cromoproteinele sunt proteine colorate din cauza grupării prostetice pe care o cuprind. Subclasa hemoproteinelor, proteine a căror grupare prostetică este hemul, cuprinde hemoglobina și mioglobina, proteine transportoare de oxigen, citocromii, proteine transportoare de electroni. O altă subclasă de cromoproteine sunt flavoproteinele, proteine colorate în galben. Cuprind drept grupare prostetică o structură derivată de la vitamina B_2 (riboflavina). Flavoproteinele funcționează ca transportori de hidrogen.

Metaloproteinele, proteine care cuprind ioni metalici sau combinații simple ale metalelor asociate direct cu apoproteina. Feritina, proteina de depozitare a fierului este alcătuită din apoferitină și ioni de fier; ceruloplasmina este o proteină ce cuprinde ioni de cupru.

Nucleoproteinele sunt alcătuite din acizii nucleici și proteine, în genere proteine bazice, asociate prin legături saline.

O aceeași proteină poate cuprinde mai multe tipuri de grupări prostetice, însumând caracterele mai multor clase de proteine conjugate, fosfo- și glicoproteine, glico- și metaloproteine etc.

Un alt mod de a sistematiza studiul proteinelor este acela după funcțiile pe care le îndeplinesc, proteine enzimatice, proteine contractile, proteine hormonale, proteine de transport etc., sau după origine în proteine plasmatice, proteine eritrocitare, proteine hepatice etc.

În toate capitolele următoare ale acestei cărți, proteinele apar ca figuri centrale prin varietatea lor structurală și multitudinea de funcții pe care le îndeplinesc, catalizatori, hormoni, anticorpi, proteine structurale, contractile etc.

Metabolismul proteinelor, sinteză și degradare, este tratat în Cap. V unde se prezintă mecanismele moleculare de legare a aminoacizilor în succesiuni dictate de informația

genetică cuprinsă în ADN şi în Cap. IX care cuprinde căile de biosinteză şi de catabolizare a aminoacizilor.

În subcapitolul următor sunt prezentate câteva grupe de proteine, care evidenţiază relaţiile structură-funcţie.

I.3.5. PROTEINELE PLASMATICE

Plasma cuprinde o cantitate mare de proteine (7—7,5 g/dl) şi de o mare diversitate (Tabelul I.9).

Prima fracţionare a proteinelor serice s-a făcut prin salifiere (salting-out) cu sulfat de amoniu şi a dus la obţinerea fracţiunii globulinelor care precipită la concentraţii saline mai joase (în jurul valorilor de semisaturaţie) şi a albuminelor (precipită la saturarea soluţiei în sare). Folosindu-se metode cu putere de rezoluţie din ce în ce mai mare, bazate pe diversele însuşiri ale proteinelor, s-a putut individualiza în plasmă un număr foarte mare de proteine (> 300).

Metoda curentă pentru separarea proteinelor plasmatice (sau serice) utilizată în laboratoarele de biochimie medicală este electroforeza. Se utilizează suporturi solide (hârtie, gel de agaroză, gel de acetat de celuloză) şi pH-ul de lucru este 8,6. La acest pH toate componentele proteice sunt încărcate negativ şi migrează spre anod. Pe electroforegramă, după colorare, proteinele apar ca benzi colorate. Prin măsurarea densităţii optice a electroforegramei, fiecare bandă dă un maxim de absorbţie (Fig. I.10).

Prin electroforeza serului, în condiţiile amintite mai sus, se obţin cinci fracţiuni: serumalbumina, α_1-, α_2-, β - şi γ-globuline.

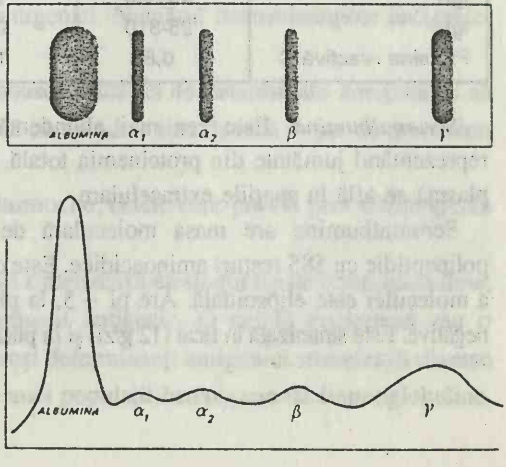


Fig. I.10 — Electroforegrama serului uman (pH 8,6). Se separă cinci fracţiunni: albumina, α_1-, α_2-, β- şi γ- globuline

Serumalbumina are mobilitatea electroforetică cea mai mare. Serumalbumina constituie o fracţiune omogenă, pe când fracţiunile globulinice, cuprinde fiecare mai multe componente individuale (Tabelul I.9).

Tabelul I.9

Proteine plasmatice (tabel selectiv)

Proteina	Conc.mg/dl	kD	pI	$t_{1/2}$
Prealbumină	20-40	54,4	4,7	12 h
Albumină	3500-4000	69	4-5,8	15-19 z
Fracţiunea α_1:				
α_1-Antiproteaza (antitripsină)	78-200	55	4,8	4 z
α_1-Glicoproteină (orosomucoid)	50-150	40	2,7-4	5 z
Apolipoproteina A	170-325	200	-	-
α_1-Fetoproteina	0,003	69	-	-
Fracţiunea α_2:				
Haptoglobina	30-215	85	4,1	2 z
α_2-Macroglobulina	125-410	800	5,4	5 z
Ceruloplasmina	20-50	160	4,4	4,5 z
Fracţiunea β:				
Transferina	200-350	77	5,7	7 z
Apolipoproteina B	60-155	3000	-	-
C_4	10-40	206	7	-
Fibrinogen	200-400	340	5,5	2,5 z
C_3	70-150	180	-	-
β_2-Microglobulină	0,1-0,2	11,8	-	-
Fracţiunea γ :				
IgG	525-1650	160	6-7,3	24 z
IgA	40-390	170	-	6 z
IgM	25-310	900	-	5 z
Proteina reactivă C	0,8	120	6,2	-

Serumalbumina. Este cea mai abundentă proteină plasmatică (3,5 — 5,5 g/dl) reprezentând jumătate din proteinemia totală. O cantitate aproximativ egală cu cea din plasmă se află în spaţiile extracelulare.

Serumalbumina are masa moleculară de 69 kD şi este alcătuită dintr-un lanţ polipeptidic cu 585 resturi aminoacidice. Este o proteină multidomenială. Forma generală a moleculei este elipsoidală. Are pI ~ 5, la pH = 7,4, poartă un număr mare de sarcini negative. Este sintetizată în ficat (12 g/zi) şi în plasmă, are un timp de înjumătăţire de 15-19 zile.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin concentraţia sa moleculară mare, serumalbumina este componentul care răspunde de 75-80% din presiunea osmotică a plasmei, având rolul de a menţine apa în compartimentul intravascular.

Serumalbumina are proprietatea de a lega, mai mult sau mai puţin specific, diverşi componenţi plasmatici, îndeplinind funcţia de transportor al acestora. Serumalbumina leagă compuşi hidrofobi, insolubili în apă, ca bilirubina, acizi graşi liberi, vitamine liposolubile. Serumalbumina este transportor plasmatic pentru unii hormoni steroizi, pentru hormoni tiroidieni. Serumalbumina leagă cationi, Ca^{2+}, Cu^{2+}. De asemenea, serumalbumina este un vehicul pentru multe medicamente: aspirină, sulfonamide, penicilină etc.

Imunoglobulinele. Imunoglobulinele (anticorpii) sunt proteine cu roluri de apărare împotriva microorganismelor — bacterii, virusuri, paraziţi — care invadează organismul. Sunt proteine solubile, se află majoritar în plasmă şi reprezintă elementele de recunoaştere ale sistemului imun umoral. Imunoglobulinele sunt sintetizate ca un răspuns specific la pătrunderea în organism a unui microorganism sau a unui compus macromolecular (proteină, polizaharid) străin (nonself). Agenţii străini capabili să declanşeze sinteza de anticorpi sunt denumiţi antigene (imunogeni). Un anticorp se combină cu antigenul specific formând un complex antigen-anticorp (complex imun) care blochează antigenul şi totodată iniţiază procese care distrug agentul patogen, fagocitoza, activarea complementului (răspuns imun).

Antigenele, microorganisme sau macromolecule, cuprind pe suprafaţa lor un mozaic de grupări chimice, fiecare dintre acestea putând declanşa sinteza unui anticorp specific. O grupare chimică sau un ansamblu de grupări care poate declanşa sinteza unui anticorp se numeşte determinant antigenic. La o proteină, un determinant antigenic este realizat de câteva resturi aminoacidice. Mioglobina, o proteină cu aproximativ 150 resturi aminoacidice posedă cinci determinanţi antigenici. Numărul determinanţilor antigenici pe o celulă bacteriană este foarte mare.

Organismul uman este capabil să recunoască orice fel de determinant antigenic şi să sintetizeze anticorpi specifici. Se estimează că un adult sintetizează în jur de un milion de specii moleculare de imunoglobuline.

Imunoglobulinele sunt sintetizate de plasmocite, celule care provin prin diferenţierea şi proliferarea limfocitelor.

Fiecare celulă şi clona celulară respectivă sintetizează un singur tip de imunoglobuline, capabile să recunoască un singur determinant antigenic. O celulă bacteriană sau o macromoleculă proteică cuprinzând numeroşi determinanţi antigenici stimulează diverse celule limfoide B ceea ce duce la sinteza unei populaţii heterogene de imunoglobuline,

anticorpi policlonali. Prin tehnici de laborator se pot obţine clone celulare care să producă fiecare molecule identice de imunoglobuline (anticorpi monoclonali).

Există mai multe clase de imunoglobuline (Ig) cu funcţii şi distribuţii diferite: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Clasa IgG cuprinde mai multe subtipuri: (IgG_1 ... IgG_4).

Imunoglobulinele M (IgM) se găsesc în principal în plasmă, în concentraţii mici, sunt sintetizate ca răspuns la primul contact al organismului cu antigenul. Sunt deosebit de eficiente în activarea celulelor fagocitante şi în activarea complementului.

Imunoglobulinele G (IgG) constituie fracţiunea majoră a imunoglobulinelor plasmatice (70-80%). Se găsesc, de asemenea, şi în lichidele interstiţiale. Sunt sintetizate în cantitate mare la al doilea contact cu antigenul. Activează complementul şi celulele fagocitare. Pot traversa placenta.

Imunoglobulinele A (IgA) se găsesc în concentraţii mici în plasmă şi în secreţiile mucoase din intestin, plămân, lacrimi, salivă, colostru. IgA constituie prima linie de apărare împotriva invaziilor cu agenţi patogeni. Nu activează complementul.

Imunoglobulinele E (IgE) sunt recunoscute ca fiind responsabile de unele manifestări ale răspunsurilor alergice. Se află fixate pe leucocite bazofile plasmatice şi pe mastocitele din pereţii vaselor şi după interacţia cu antigenele celulare activate mediază răspunsurile alergice (secreţii de histamină, uneori serotonină).

Imunoglobulinele D (IgD) sunt prezente în plasmă în cele mai mici concentraţii; nu se cunoaşte exact ce funcţie specifică au.

Structura imunoglobulinelor. Diversitatea moleculară a Ig (aproximativ 10^6 specii moleculare) se realizează în cadrul unei scheme structurale unice (Fig. I.11). Sunt tetrameri cu formula moleculară H_2L_2. Lanţurile H (de la heavy, greu) cuprind aproximativ 440 resturi aminoacidice (446 pentru lanţurile H din IgG) şi au mase de 53-75 kD. Lanţurile L (de la light, uşor) cuprind aproximativ 220 resturi aminoacidice (214 la IgG) şi au mase de 23 kD. Lanţurile H sunt diferite de la o clasă la alta, lanţuri γ la IgG, μ la IgM, α la IgA, ε la IgE şi δ la IgD. Lanţurile L, la toate clasele sunt fie lanţuri λ, fie k. Unele imunoglobuline apar sub formă de oligomeri ai structurii de bază, dimeri (IgA) sau pentameri (IgM) (Fig.I.12).

Structura generală a unei molecule de imunoglobulină este arătată schematic în Fig.I.11. Molecula are forma literei Y. Lanţurile L şi H se asociază începând cu capetele lor N-terminale şi formează braţele literei Y. Cele două jumătăţi C-terminale ale lanţurilor H alcătuiesc coada moleculei. Imunoglobulinele cuprind componente oligozaharidice legate N-glicozidic. Între lanţuri şi interlanţ există numeroase punţi disulfurice.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

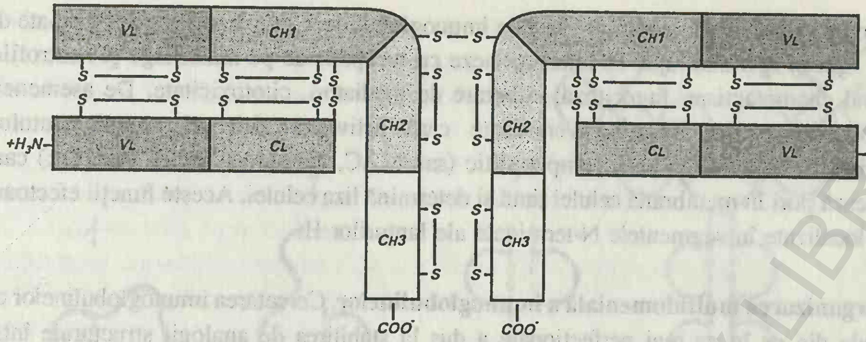


Fig. I.11 - Structura generală a unei imunoglobuline (Ig)

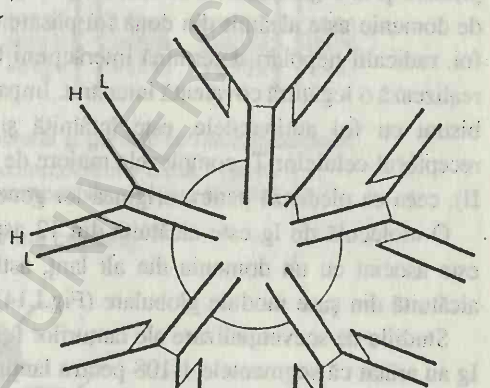


Fig. I.12 - Structura pentamerică a imunoglobulinelor M (IgM)

Funcţiile imunoglobulinelor. Funcţia principală a unei imunoglobuline sau anticorp (Ac) este aceea de a recunoaşte şi de a se combina cu antigenul sau determinantul antigenic (Ag), formând complexul Ag-Ac:

$$Ag + Ac \rightleftharpoons Ag \cdot Ac$$

O moleculă tetramerică de Ig este bivalentă, cuprinde două situsuri de legare, cu aceeaşi specificitate, alcătuite din capetele N-terminale ale lanţurilor H şi L.

Interacţiunile dintre Ac şi Ag sunt necovalente, interacţiuni hidrofobe, polare, punţi de hidrogen şi se bazează pe complementaritatea chimică şi sterică dintre determinantul antigenic şi situsul de legare al Ig. Acest gen de interacţiune are un grad foarte înalt de specificitate, afinităţile antigenelor pentru anticorpii specifici sunt foarte mari (k_d pentru complexele Ag·Ac au valori de 10^{-4}-10^{-10} M) factorii determinanţi ai acestor interacţiuni sunt vitezele de difuziune, fiecare întâlnire dintre Ag şi Ac este eficace.

Fixarea Ag la Ac şi formarea complexelor Ag·Ac este urmată de evenimente care vor duce la omorârea microorganismului invadator, la distrugerea antigenului. Aceste funcţii

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

efectoare sunt comune pentru o clasă de imunoglobuline. Complexele Ag·Ac formate de către IgM şi IgG sunt apte să interacţioneze cu receptori de pe macrofage şi neutrofile, iniţiind chemotactism, fagocitoză, eliberare de mediatori, citotoxicitate. De asemenea, complexele Ag·Ac iniţiază evenimente care activează sistemul complementului, culminând cu formarea unui complex litic (sau MAC, membrane attack complex) care formează pori în membrana celulei ţintă şi determină liza celulei. Aceste funcţii efectoare sunt localizate în segmentele N-terminale ale lanţurilor H.

Organizarea multidomenială a imunoglobulinelor. Cercetarea imunoglobulinelor cu metode din ce în ce mai perfecţionate a dus la stabilirea de analogii structurale între diversele porţiuni ale lanţurilor L şi H. Segmente cu lungimi de aproximativ 110 resturi aminoacidice, două în lanţuri L şi 4 în lanţuri H, prezintă analogii la nivelul structurilor primare şi al organizării lor secundare şi terţiare, alcătuind domenii structurale. Un astfel de domeniu este alcătuit din două foi plisate cu lanţuri antiparalele cu structură β. Între foi, radicalii nepolari determină interacţiuni hidrofobe puternice şi o punte disulfurică, realizează o legătură covalentă interstrat. Împachetarea specifică a unui astfel de domeniu bistrat cu foi antiparalele, este întâlnită şi la alte proteine (immunoglobulin fold) receptorul celulelor T, complexele majore de histocompatibilitate (MHC clasa I şi clasa II), ceea ce pledează pentru originea lor genetică comună (Fig.I.13).

O moleculă de Ig este alcătuită din 12 astfel de domenii. Un domeniu dintr-un lanţ este asociat cu un domeniu din alt lanţ, astfel încât întreaga moleculă apare ca fiind alcătuită din şase module globulare (Fig.I.14).

Studiile de secvenţializare ale lanţurilor L şi H din populaţii omogene, individuale de Ig au arătat că segmentele 1-108 pentru lanţurile L şi 1-125 pentru lanţurile H diferă de la o moleculă la alta, sunt domenii variabile V_L şi V_H. Celelalte segmente au structuri primare aproape identice pentru fiecare clasă de Ig, sunt regiuni constante C_L şi C_H. Regiunea constantă a lanţurilor L corespunde unui singur domeniu C_L. Regiunea C_H cuprinde trei domenii constante C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} (la IgG).

În structura cuaternară a unei Ig, domeniile V_L şi V_H formează situsurile de legare a antigenului, ceea ce permite, în raport cu structura primară a V_L şi V_H, realizarea de centre de legare cu specificităţi diferite. Variabilitatea acestor domenii nu este însă aceeaşi pe toată lungimea lanţului. Lanţurile L cuprind trei zone şi lanţurile H patru zone cu un grad de variabilitate mai mare, zone hipervariabile. Resturile aminoacidice corespunzătoare acestor zone căptuşesc nişa nepolară unde este fixat determinantul antigenic.

Regiunea C_H cuprinde situsurile efectoare care mediază funcţiile comune întregii clase de imunoglobuline. Funcţia de activare a complementului este domeniul C_{H2}, receptorii pentru macrofage şi neutrofile sunt localizaţi pe C_{H3}.

Organizarea structurală a imunoglobulinelor arată modul în care pe o schemă structurală comună sunt constituite milioane de molecule, diferite prin situsurile de legare a antigenelor.

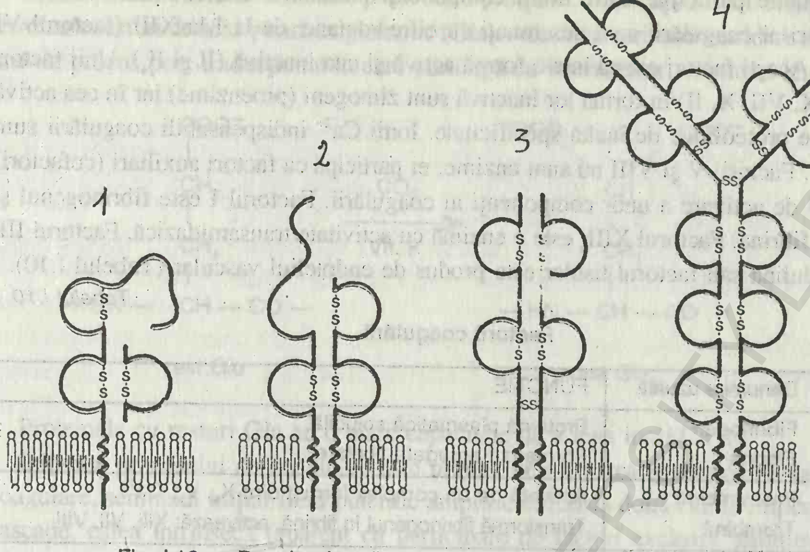


Fig. I.13 — Proteine înrudite structural şi genetic cu imunoglobinele:
1. Complex major de histocompatibilitate clasa I (MHC I)
2. Complex major de histocompatibilitate clasa II (MHC II)
3. Receptorul celulelor T
4. Ig M (ancorată în membrana celulară)

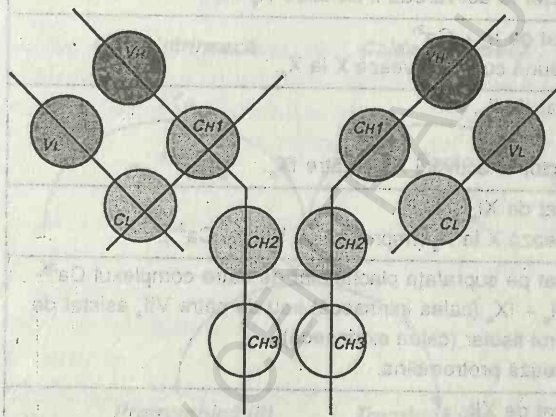


Fig. I.14 — Structura multidomenială a unei imunoglobuline

Factori ai coagulării (fibrinogenul): Coagularea sângelui reprezintă un mecanism de apărare pentru a împiedica hemoragiile. Este o componentă a hemostazei care mai implică şi alte fenomene: vasoconstricţie, activarea şi aderarea trombocitelor la locul leziunii vasculare. Formarea chiagului (trombus) are loc prin transformarea fibrinogenului, proteină plasmatică solubilă, în fibrină, insolubilă, care formează o reţea în care sunt înglobate trombocite şi hematii. Coagularea este un proces care se autoreglează, menţinându-se un echilibru foarte fin între hemoragie şi tromboză.

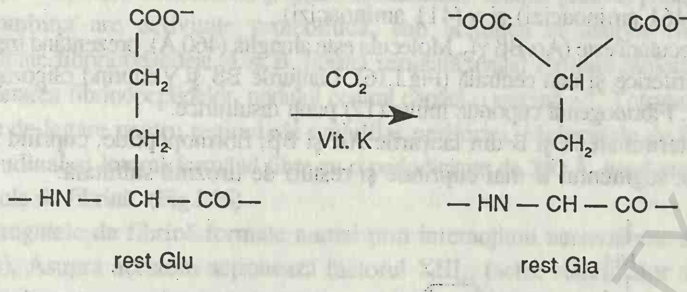
La coagulare participă foarte mulţi componenţi plasmatici sau tisulari. Unii dintre aceşti factori ai coagulării sunt desemnaţi cu cifre romane, de la I la XIII (factorul VI nu există). Aceşti factori există într-o formă activă şi una inactivă (II şi II_a). Unii factori (XII, XI, IX, VII, X, II) în forma lor inactivă sunt zimogeni (proenzime) iar în cea activă sunt enzime proteolitice de înaltă specificitate. Ionii Ca^{2+} indispensabili coagulării sunt factorul IV. Factorii V şi VIII nu sunt enzime, ei participă ca factori auxiliari (cofactori) în procesul de activare a unor componenţi ai coagulării. Factorul I este fibrinogenul şi factorul I_a, fibrina. Factorul XIII_a este o enzimă cu activitate transamidazică. Factorul III, trombomodulină sau factorul tisular este produs de endoteliul vascular (Tabelul I.10).

Tabelul I.10

Factorii coagulării

Factor	Denumire uzuală	FUNCŢIE
I I_a	Fibrinogen Fibrină	Proteină plasmatică solubilă. Formează agregate fibrilare.
II II_a	Protrombină Trombină	Activată de un complex format din: X_a, V_a, Ca^{2+}. Transformă fibrinogenul în fibrină, activează: XIII, VII, VIII.
III	Factorul tisular, trombomodulină.	Factor auxiliar la activarea factorilor X,V.
IV	Ca^{2+}	
V V_a	Proaccelerină	Activat de trombină. Cofactor la activareaa II de către X_a.
VII VII_a	Proconvertina	Activat de II_a + Ca^{2+}. Împreună cu III activează X la X_a.
VIII VIII_a	Factor antihemofilic	Activat de II_a. Cofactor al activării X de către IX_a.
IX IX_a	Factor Christmas	Activat de XI_a şi Ca^{2+}. Activează X la X_a (împreună cu VIII_a şi Ca^{2+}).
X X_a	Factor Stuart-Prower	Activat pe suprafaţa plachetelor de către complexul Ca^{2+} + VIII_a + IX_a (calea intrinsecă) sau de către VII_a asistat de factorul tisular (calea extrinsecă). Activează protrombina.
XI XI_a		Activat de XII_a. Activează, împreună cu Ca^{2+}, IX la IXa.
XII XII_a	Factor Hageman	Activat de kalikreină. Se leagă de peretele vasului lezat.
XIII XIII_a	Factor stabilizator al fibrinei	Activat de trombină. Stabilizează fibrina prin legături încrucişate.

Protrombina, factorii VII, IX şi X sunt proteine care cuprind în segmentele N-terminale resturi de acid γ-carboxiglutamic (Gla). Aceste resturi aminoacidice se formează într-un proces post-traducţional la care participă ca intermediar, vitamina K:



Proteinele cu resturi Gla au o mare capacitate de a lega ionii Ca^{2+}.

Iniţierea procesului de coagulare este urmată de activarea în cascadă a factorilor de coagulare, semnalul iniţial fiind puternic amplificat. Există două căi de iniţiere a acestei cascade, calea intrinsecă (aparent cu participare de factori exclusiv sanguini) şi calea extrinsecă, la care participă şi factori de origine tisulară. Ambele căi conduc la activarea protrombinei în trombină, aceasta din urmă transformă fibrinogenul în fibrină. Agregatele de trombină sub acţiunea factorului XIII_a (activat de trombină) sunt legate încrucişat şi devin insolubile (Fig.I.15).

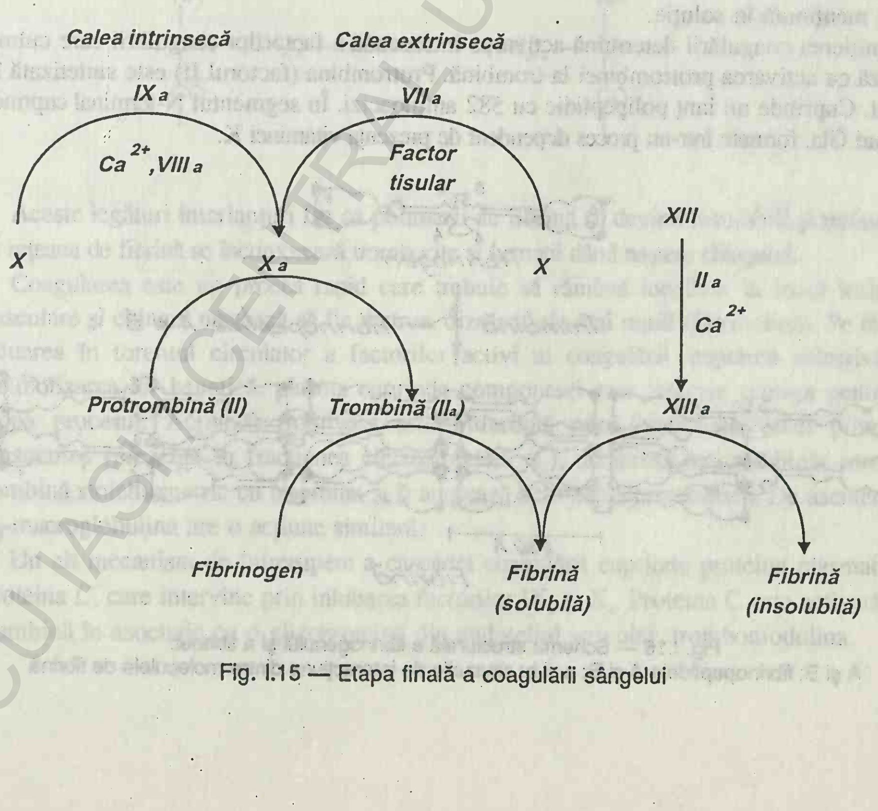


Fig. I.15 — Etapa finală a coagulării sângelui

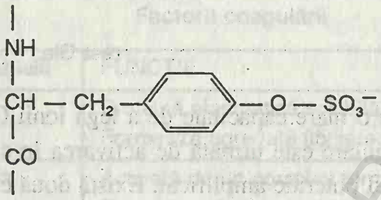
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cele ce urmează sunt descrise unele aspecte biochimice, moleculare, ale coagulării.

Fibrinogenul are un rol central în coagulare. Este o proteină plasmatică cu masa moleculară de 340 kD. Concentrația sa plasmatică este de 200-400 mg/dl (2-3% din proteinemia totală). Este un hexamer alcătuit din trei tipuri de lanțuri: Aα (610 aminoacizi), Bβ (461 aminoacizi) și γ (411 aminoacizi).

Formula sa moleculară este $(A\alpha B\beta \gamma)_2$. Molecula este alungită (460 Å), prezentând trei zone globulare, două periferice și una centrală (Fig.I.16). Lanțurile Bβ și γ cuprind oligozaharide legate N-glicozidic. Fibrinogenul cuprinde multe (17) punți disulfurice.

Segmentele N-terminale A și B din lanțurile Aα și Bβ, fibrinopeptide, cuprind multe resturi Glu și Asp, segmentul B mai cuprinde și resturi de tirozină sulfatată:



Această compoziție aminoacidică conferă fibrinopeptidelor sarcini (—).

Trimerul Aα Bβ γ se formează prin asocierea paralelă a celor trei lanțuri și doi trimeri se asociază prin capetele lor N-terminale, fibrinopeptidele apărând ca proeminențe ale nodului central. Nodulul central are o sarcină netă negativă (-8) ca și nodulii periferici. Repulsiile electrostatice între moleculele de fibrinogen previn agregarea lor și proteina este menținută în soluție.

Inițierea coagulării determină activarea în cascadă a factorilor coagulării care culminează cu activarea protrombinei la trombină. Protrombina (factorul II) este sintetizată în ficat. Cuprinde un lanț polipeptidic cu 582 aminoacizi. În segmentul N-terminal cuprinde resturi Gla, formate într-un proces dependent de prezența vitaminei K.

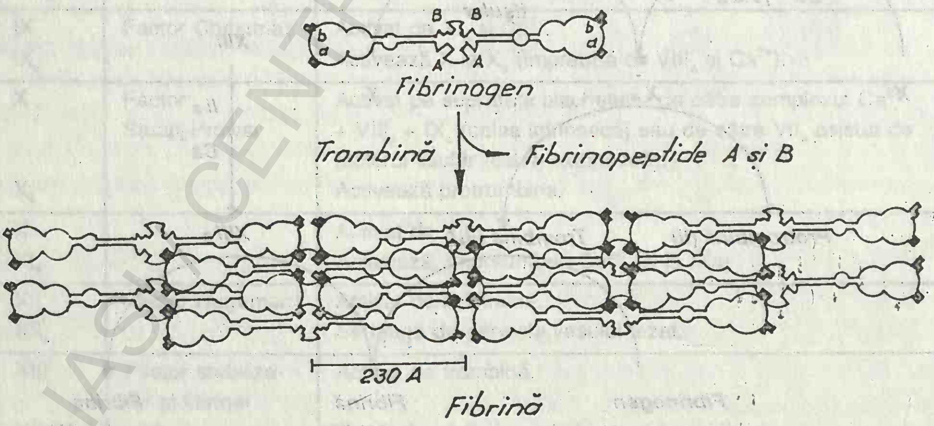


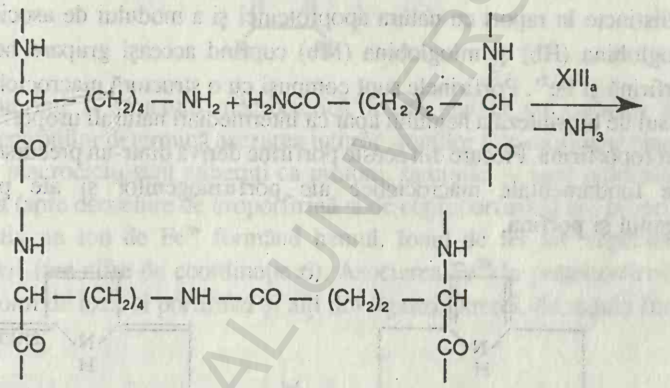
Fig. I.16 — Schema structurală a fibrinogenului și a fibrinei.
A și B: fibrinopeptidele A și B; a și b: situsurile de interacțiune dintre moleculele de fibrină

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sub acţiunea factorului X_a, o protează, sunt scindate câteva legături peptidice şi protrombina este transformată în trombină. În această transformare se pierde segmentul N-terminal care cuprinde resturile Gla. Trombina este alcătuită din două lanţuri polipeptidice, A(49 aminoacizi) şi B(259 aminoacizi), reunite printr-o punte disulfurică.

Trombina are activitate proteolitică, sub acţiunea ei asupra fibrinogenului sunt îndepărtate fibrinopeptidele A şi B, fibrina rezultată având formula moleculară $(\alpha\ \beta\ \gamma)_2$. Prin îndepărtarea fibrinopeptidelor, nodulul central capătă o sarcină +5. Totodată sunt demascate centre de legare pentru regiuni ale nodulilor periferici. Moleculele de fibrină se asociază longitudinal şi lateral formând fibre cu o periodicitate de 230 Å, jumătate din lungimea unei molecule de fibrină (Fig.I.16)

Agregatele de fibrină formate numai prin interacţiuni necovalente sunt fragile (chiag moale). Asupra acestora acţionează factorul XIII_a, factor stabilizator al fibrinei, enzimă cu activitate transamidazică, leagă încrucişat resturi lizil şi glutaminil:



Aceste legături interlanţuri fac ca polimerii de fibrină să devină insolubili şi rezistenţi. În reţeaua de fibrină se încorporează trombocite şi hematii dând naştere chiagului.

Coagularea este un proces rapid care trebuie să rămână localizat la locul leziunii vasculare şi chiagul urmează să fie distrus, dizolvat cât mai rapid (fibrinoliză). Pe lângă diluarea în torentul circulator a factorilor activi ai coagulării, captarea selectivă şi catabolizarea lor hepatică, plasma cuprinde componenţi care intervin prompt pentru a stopa procesul. Acţiunea trombinei este întreruptă prin intermediul unei proteine plasmatice (prezentă în fracţiunea electroforetică α_1), denumită antitrombină, care se combină stoichiometric cu trombina şi îi anulează activitatea proteolitică. De asemenea, α_2-macroglobulina are o acţiune similară.

Un alt mecanism de întrerupere a cascadei coagulării cuprinde proteina plasmatică, Proteina C, care intervine prin inhibarea factorilor IX_a şi X_a. Proteina C este activată de trombină în asociaţie cu o glicoproteină din endoteliul vascular, trombomodulina.

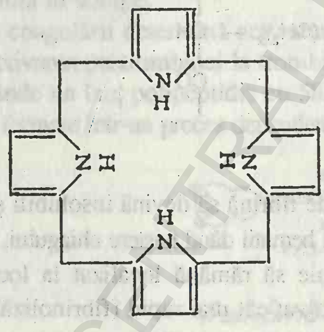
Fibrinoliza. Plasma cuprinde şi componenţii necesari dezagregării şi dizolvării chiagului. Aceştia rămân inactivi până când se impune intrarea lor în acţiune. Etapa finală a fibrinolizei este catalizată de plasmină, enzimă proteolitică, care transformă fibrina în fragmente solubile. Plasmina provine dintr-un precursor plasmatic inactiv, plasminogen, care este încorporat în reţeaua de fibrină. El este activat de o protează eliberată de endoteliul vascular, factorul tisular activator al plasminogenului.

I.3.6. HEMOPROTEINELE

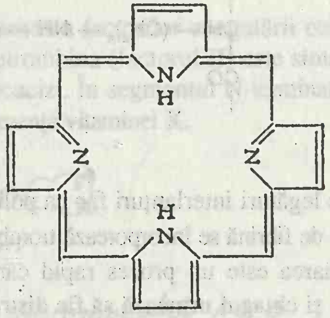
Acest grup de proteine conjugate cuprinde mioglobina şi hemoglobina, transportori de oxigen, citocromii, transportori de electroni, membri ai lanţului respirator mitocondrial şi ai aceluia situat în reticulul endoplasmic hepatic, diverse oxidaze şi peroxidaze.

Gruparea prostetică a acestor proteine este hemul. Varietatea hemoproteinelor rezultă prin unele diferenţe în structura hemului sau pentru aceiaşi grupare hem pot rezulta entităţi distincte în raport cu natura apoproteinei şi a modului de asociere cu hemul.

Hemoglobina (Hb) şi mioglobina (Mb) cuprind aceeaşi grupare hem, alcătuită din protoporfirină şi Fe^{2+}. Porfirinele sunt compuşi cu o structură macrociclică, tetrapirolică. În procesul de biosinteză a hemului apar ca intermediari naturali uroporfirina, coproporfirina şi protoporfirina. Fiecare din aceste porfirine derivă dintr-un precursor porfirinogenic. Nucleele fundamentale macrociclice ale porfirinogenilor şi ale porfirinelor sunt: porfinogenul şi porfina.



Porfinogen



Porfina

Porfirinogenii şi porfirinele poartă în poziţiile 1-8 următorii substituenţi:

uroporfirinogenul şi uroporfirina:

1, 3, 5, 8	- grupări	$— CH_2 — COOH$
2, 4, 6, 7	,,	$— CH_2 — CH_2 — COOH$

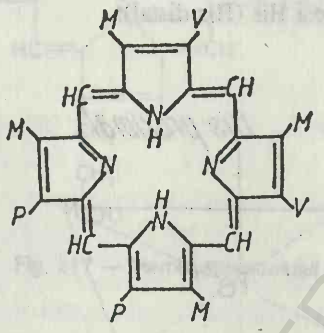
coproporfirinogenul şi coproporfirina:

1, 3, 5, 8	- grupări	$— CH_3$
2, 4, 6, 7,	,,	$— CH_2 — CH_2 — COOH$

protoporfirinogenul şi protoporfirina:

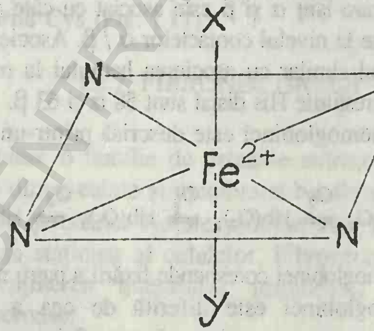
1, 3, 5, 8 - grupări — CH_3 (M)
2, 4 " — $CH = CH_2$ (vinil, V)
6, 7 " — $CH_2 — CH_2 — COOH$ (P)

Formula protoporfirinei este:



Porfirinele cuprind o structură macrociclică foarte stabilă cu caracter aromatic. Delocalizarea electronilor determină aşezarea tuturor atomilor într-un singur plan. Atomii de hidrogen din macrociclu sunt eliberaţi ca protoni, sarcinile — sunt delocalizate.

Protoporfirina (spre deosebire de uroporfirină şi de coproporfirină) are proprietatea de a lega coordinativ un ion de Fe^{2+} formând hemul. Ionul de fer are capacitatea de a coordina 6 liganzi (are cifre de coordinaţie 6). Asocierea Fe^{2+} la protoporfirină se face prin cei patru atomi de azot ai porfirinei şi alţi doi liganzi externi, de regulă furnizaţi de grupări din proteină:

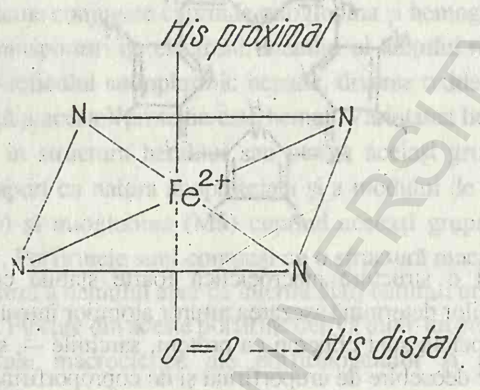


Mioglobina este o hemoproteină care funcţionează ca transportor tisular de O_2, prin legarea reversibilă a dioxigenului:

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea proteică, globina, este alcătuită dintr-un singur lanţ polipeptidic (cu 153 resturi aminoacidice) împachetat într-o globulă compactă. Cuprinde o grupare hem fixată într-un buzunar, căptuşit cu resturi aminoacidice hidrofobe. Legarea hemului la globină este diferită după starea sa oxigenată sau deoxigenată. În forma deoxigenată, ligandul extern X este reprezentat de un rest His din lanţul polipeptidic (His proximal) şi poziţia Y de coordinare a Fe^{2+} este vacantă. În forma oxigenată, poziţia Y este ocupată de dioxigen, care la rândul lui contractează o a doua legătură coordinativă slabă cu un alt rest His (His distal):



Acest gen de asociere dintre hem şi proteină face posibilă oxigenarea reversibilă a mioglobinei, fără modificarea valenţei fierului.

Hemoglobina este o proteină tetramerică, forma principală din sângele adultului are formula moleculară $\alpha_2\beta_2$. Fiecare lanţ α şi β este asociat cu câte o grupare hem. Locurile de legare a hemului sunt situate la nivelul contactelor α / β. Asocierea dintre hem şi fiecare lanţ protomeric se face în mod similar cu asocierea hemului la mioglobină. Resturile His proximal sunt 87 α şi 93 β iar resturile His distal sunt 58 α şi 63 β.

Oxigenarea reversibilă a hemoglobinei este descrisă printr-un şir de reacţii:

$$Hb \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HbO_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_3 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_4$$

Oxigenarea maximală a hemoglobinei corespunde fixării a patru molecule de dioxigen.

Cinetica oxigenării hemoglobinei este diferită de cea a mioglobinei, structura cuaternară permite funcţionarea unor mecanisme foarte eficiente de reglare (vezi Cap.II). Totodată, hemoglobina, pe lângă transportul de oxigen are şi funcţia de transportor de protoni şi de dioxid de carbon.

Citocromii sunt hemoproteine care transportă electroni, prin schimbarea reversibilă a valenţei fierului:

$$\text{cit } Fe^{3+} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} \text{cit } Fe^{2+}$$

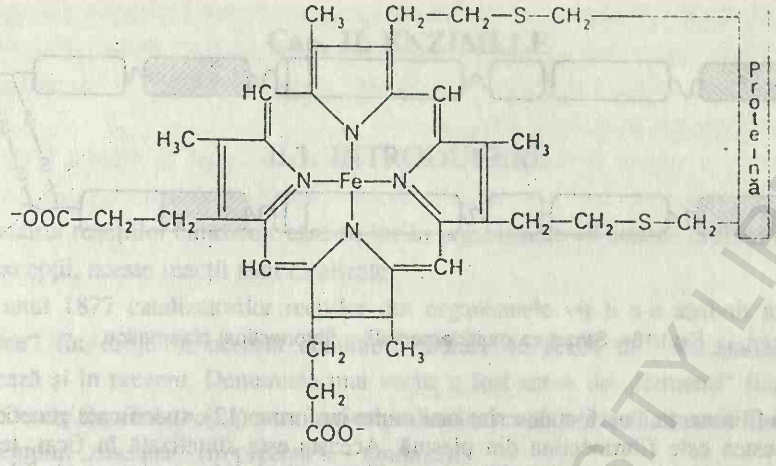


Fig. I.17 — Hemul citocromului c

Citocromii mitocondriali (a, a_3, b, c, c_1) acţionează secvenţial, electronii trec de la un component la altul, în final fiind acceptaţi de dioxigen:

$$4 \text{ cit } Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow 4 \text{ cit } Fe^{3+} + 2O^{2-}$$
$$2O^{2-} + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O$$

Citocromul c, cel mai bine studiat, cuprinde un lanţ polipeptidic cu 104 resturi aminoacidice şi o grupare hem. Asocierea dintre hem şi proteină este diferită de cea întâlnită la hemoglobină sau mioglobină. Ligandul X este reprezentat de un rest His (18) şi poziţia Y este permanent ocupată cu un rest Met (80). Grupările vinil sunt legate covalent la resturile Cys (Fig. I.17).

I.3.7. FIBRONECTINELE

Fibronectinele alcătuiesc o familie de proteine extracelulare adezive. Ele au roluri majore în interacţiunile dintre celule şi membrane bazale sau dintre diverşi componenţi ai matricei extracelulare şi celule. Aceste procese sunt cruciale pentru determinarea caracterului migrator sau staţionar al celulelor. Fibronectinele au roluri importante în embriogeneză, în menţinerea integrităţii ţesuturilor, în hemostază, determină migrarea celulelor canceroase.

Fibronectinele sunt proteine dimerice, protomerii A şi B au mase de aproximativ 250 kD şi prezintă o înaltă omologie structurală. În dimer capetele C-terminale ale lanţurilor A şi B sunt reunite prin două punţi disulfurice (Fig.I.18). Dimerul este o moleculă alungită (600 Å/25 Å). Protomerii A şi B sunt organizaţi în mai multe domenii structurale, fiecare domeniu fiind caracterizat prin capacitatea sa distinctă de a se lega la alţi componenţi.

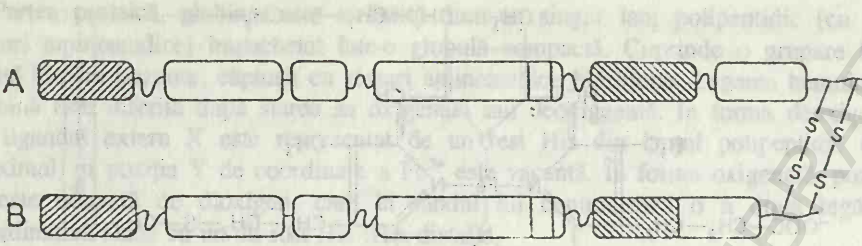


Fig.I.18 - Structura multidomenială a fibronectinei plasmatice

Pentru fibronectină au fost descrise mai multe izoforme (12), specificate genetic. Una dintre acestea este fibronectina din plasmă. Aceasta este sintetizată în ficat, țesut în care nu se mai exprimă nici o altă genă a fibronectinei. Alte izoforme ale fibronectinei sunt sintetizate de diverse alte tipuri celulare. Cea produsă de fibroblaști este printre cea mai mult studiată și mai bine cunoscută fibronectină. Fibronectinele după sinteză intracelulară sunt secretate în matricea extracelulară locală unde funcționează. Toate țesuturile cuprind fibronectină.

Fibronectinele au capacitatea de a stabili legături cu alte proteine, astfel se realizează o rețea de interacțiuni care conectează proteine extracelulare (colagen, laminină, vitronectină) și mucopolizaharide (proteoglicani) cu receptori membranari (integrine) și cu proteine intracelulare care alcătuiesc citoscheletul (actină, α-actinină, vinculină).

O moleculă de fibronectină posedă mai multe domenii structurale prin intermediul cărora interacționează cu componenții enumerați mai sus. Au fost identificate domeniile de legare la colagen, heparină, fibrină, actină ca și domeniul de interacțiune cu o celulă.

Interacțiunea dintre fibronectină (fibronectina plasmatică) și celule are loc prin intermediul unui domeniu de aproximativ 75 kD situat în jumătatea C-terminală a lanțurilor A și B. Situsul de legare specific cuprinde secvența Arg — Gly — Asp — Ser (RGDS). Peptide mici de sinteză care cuprind acest segment sunt apte să adere pe suprafața celulelor.

Receptorul celular pentru fibronectină, care recunoaște secvența RGDS, a fost identificat în toate tipurile de celule. Acest receptor face parte dintr-o familie de receptori care recunosc și interacționează cu diverse proteine adezive, familia integrinelor. Integrina specifică pentru fibronectină este o glicoproteină, un heterodimer α β.

Integrina din plachete (glicoproteina II_b — III_a) este distinctă de cea a altor celule. Integrina plachetelor, pe lângă fibronectină, interacționează și cu fibrinogen, fibrină, cu factorul von Willebrand.

Fibronectina plasmatică are un rol deosebit în formarea cheagului, prin legare de fibrină, fibronectina este încorporată în cheag. Prin multifuncționalitatea sa fibronectina asigură ancorarea cheagului la celule și pe matricea structurală a pereților vaselor.

Cap. II. ENZIMELE

II.1. INTRODUCERE

Numărul reacţiilor cunoscute care au loc in organismele vii este de ordinul miilor; cu rare excepţii, aceste reacţii sunt catalizate.

În anul 1877 catalizatorilor recţiilor din organismele vii li s-a atribuit numele de „enzime" (în drojdie); această denumire, alături de aceea de „biocatalizatori", se utilizează şi în prezent. Denumirea mai veche a fost aceea de „fermenţi" (legată şi ea de procesele fermentative); pentru enzime individuale s-au utilizat denumiri specifice, ca de exemplu, „diastaza" (în prezent α - amilaza).

Locul de acţiune al celor mai multe enzime este în interiorul celulelor; unele acţionează însă şi în afara acestora (de exemplu, o serie de enzime din plasma sanguină între care si cele care asigură coagularea). Toate enzimele specifice unui tip de celule sunt sintetizate chiar de acele celule; enzimele care acţionează în afara celulelor sunt sintetizate doar de anumite tipuri de celule (hepatice, renale etc.).

Enzimele au toate însuşirile catalizatorilor utilizaţi în reacţiile chimice din lumea nevie. Ele sunt însă superioare acestor catalizatori în mai multe privinţe:

a) Asigură reacţiilor chimice pe care le catalizează viteze cu câteva ordine de mărime în plus;

b) Reacţiile pe care le catalizează au loc în condiţii blânde: temperatură sub 50^0C, presiune atmosferică, pH în jurul lui 7; există, evident, şi unele excepţii. Comparativ, catalizatorii chimici acţionează la temperaturi ridicate, presiuni mari şi valori extreme de pH;

c) Au specificitate foarte mare ceea ce asigură ca în reacţiile pe care le catalizează să nu se formeze produşi secundari.

Multe enzime au însuşiri neîntâlnite la catalizatori chimici. Foarte importante sunt:

a) Capacitatea de reglare a producerii lor în celule şi/sau de reglare a activităţii;

b) Posibilitatea catalizării unor reacţii endergonice prin cuplarea acestora cu reacţii exergonice (vezi capitolul „Energetica biochimică").

Istoria enzimologiei se întinde pe două sute de ani. Marile descoperiri realizate până la mijlocul secolului nostru au fost rodul gândirii şi experienţelor individuale ale unor chimişti organicieni, fiziologi, microbiologi, captivaţi de acest domeniu: Gay-Lussac, Liebig, Berzelius, Kühne, Emil Fischer, Pasteur şi alţii. Totuşi, ca şi în multe alte domenii ale biochimiei, abia în ultima jumătate a secolului nostru, prin cercetări efectuate de grupuri ultraspecializate şi cu mijloace tehnice din ce în ce mai perfecţionate,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

s-a putut ajunge la o înţelegere profundă a naturii şi funcţionării enzimelor. Cunoştinţele de enzimologie sunt extrem de utile în prezent pentru interpretarea multor fenomene din biologia celulară, genetică şi alte ştiinţe biologice. Ingineria genetică se bazează aproape exclusiv pe acţiunile specifice ale unor enzime.

Din punct de vedere medical, enzimologia contribuie astăzi în măsură hotărâtoare la cunoaşterea cauzelor a numeroase boli, diagnosticul şi urmărirea evoluţiei acestora, elaborarea pe baze ştinţifice a medicamentelor şi multe altele.

II.2. SCĂDEREA DE CĂTRE ENZIME A ENERGIEI DE ACTIVARE A REACŢIILOR. CAPACITATEA CATALITICĂ A ENZIMELOR

Toate reacţiile chimice sunt însoţite de variaţii ale energiei. În reacţiile care au loc în lumea nevie, variaţiile de energie se urmăresc în mod curent prin variaţia căldurii (entalpiei); după cum ele eliberează sau absorb căldura sunt „exoterme“ respectiv „endoterme“. Dacă reacţiile au loc în condiţii de temperatură şi presiune constantă, parametrul termodinamic urmărit este altul, respectiv variaţia energiei libere, notată ΔG. În cazul reacţiilor care au loc în organismele vii superioare, la care cei doi parametri sunt constanţi, se urmăreşte, de asemenea, variaţia energiei interne. Dacă ΔG în cursul reacţiei este negativă (ceea ce corespunde eliberării de energie), reacţia este „exergonică“; invers, reacţia este „endergonică“.

În cazul reacţiilor exergonice, care constituie obiectul discuţiei ce urmeză, energia medie a moleculelor reactanţilor este mai mare decât energia medie a produşilor de reacţie. Deoarece produşii de reacţie sunt mai stabili decât reactanţii, s-ar putea crede că reacţiile în care se eliberează energie sunt şi spontane. Totuşi, cu foarte rare excepţii, desfăşurarea acestor reacţii este condiţionată de furnizarea unei anumite cantităţi de energie; abia după ce au fost „amorsate“ ele devin eliberatoare de energie. De exemplu, oxidarea glucozei cu O_2 este o reacţie în care se eliberează energie; totuşi glucoza rezistă contactului permanent cu acest element luni de zile, chiar şi ani, dacă reacţia nu este declanşată prin furnizarea unei cantităţi de energie.

Energia furnizată reacţiei are rolul de a mări numărul de ciocniri între reactanţi, inclusiv a celor eficace; este vorba de ciocniri din care rezultă „complexe de tranziţie“ stări prin intermediul cărora au loc transformările substratelor în produşi de reacţie. Această energie este cunoscută sub numele de „energie de activare“ şi este definită ca „energia necesară pentru ca toate moleculele dintr-un mol de reactant să atingă starea de tranziţie“. Ea se exprimă, evident, în Kj/mol sau Kcal/mol şi este specifică fiecărei reacţii.

În laborator sau industrie, energia de activare necesară reacţiilor este furnizată sub formă de căldură. Imposibilitatea ca reacţiile chimice din organismele vii să fie influenţate de căldură este compensată de către enzime, care, asemănător tuturor catalizatorilor, scad energia de activare. Cu cât un catalizator scade mai mult energia de activare a reacţiei pe care o catalizează cu atât el este mai eficace adică asigură o viteză mai mare acelei reacţii.

Enzimele scad foarte mult energia de activare în raport cu catalizatorii chimici. Reacţia de descompunere a apei oxigenate poate servi ca exemplu în acest sens:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

În absenţa catalizatorilor energia de activare are valoarea de 18 Kcal/mol; ea este de 11,7 Kcal/mol în prezenţa catalizatorului de platină coloidală şi de numai 2 Kcal/mol în prezenţa catalazei, enzima cu specificitate absolută pentru această reacţie (Fig. II.1.). Aşa se explică capacitatea catalitică deosebit de mare a catalazei: o singură moleculă din această enzimă descompune 5×10^6 molecule de apă oxigenată într-un minut, în condiţii optime. Există şi enzime care asigură viteze de reacţie de ordinul 10^{10} - 10^{12} în raport cu reacţiile corespunzătoare necatalizate.

Scăderea de către catalizatori a energiei de activare este consecinţa cursului diferit pe care aceştia îl imprimă reacţiei. Se ştie că orice reacţie catalizată decurge şi în absenţa catalizatorului dar cu viteză foarte mică. În acest caz substratul (S) se transformă direct în produs de reacţie (P).

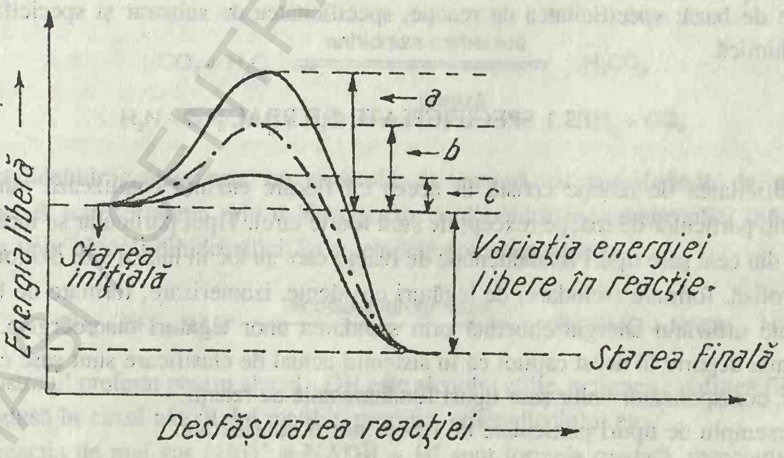


Fig. II.1. Energia de activare pentru descompunerea apei oxigenate: a) fără catalizator; b) în prezenţa Pt coloidale; c) în prezenţa catalzei.

Când este prezent catalizatorul, în cazul reacţiilor din lumea vie enzima (E), între aceasta şi substrat se formează un complex ES din care apoi rezultă P şi se reface E:

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

În conformitate cu cele afirmate mai înainte, energia de activare pentru transformarea lui S din ES în P este mult mai mică decât la transformarea directă a lui S în P.

În Fig. II.1. este reprezentat şi faptul că într-o reacţie exergonică declanşată prin furnizarea energiei de activare, se eliberează o cantitate de energie care este suma energiei de activare + variaţia energiei libere specifice (diferenţa între energia medie a reactanţilor şi a produşilor).

Desigur că în organismele vii, alături de reacţiile exergonice, au loc numeroase reacţii endergonice. Ele sunt posibile prin faptul că există enzime specializate, care, pe lângă scăderea energiei de activare, asigură şi transferul energiei libere necesare de la reacţii exergonice. Desfăşurarea acestor reacţii este prezentată în capitolul „Energetica biochimică".

II.3. SPECIFICITATEA ENZIMELOR

Înalta specificitate este una dintre caracteristicile fundamentale ale enzimelor. Consecinţe ale acestei specificităţi deosebite sunt atât evitarea formării de produşi secundari în reacţii, cât şi, pe un plan mai general, existenţa însăşi a căilor metabolice (în sensul că succesiunea reacţiilor, de exemplu într-un compartiment celular, este impusă de enzimele existente).

Modalităţile de manifestare ale specificităţii sunt diverse. Se pot considera totuşi trei variante de bază: specificitatea de reacţie, specificitatea de substrat şi specicificitatea stereochimică.

II.3.1 SPECIFICITATE DE REACŢIE

Specificitatea de reacţie constă în aceea că fiecare enzimă catalizează numai un singur tip particular de reacţie (excepţiile sunt foarte rare). Tipul particular se încadrează în unul din cele şase tipuri fundamentale de reacţii care au loc în lumea vie: oxidoreducere, hidroliză, formare (scindare) de legături covalente, izomerizare, formare de legături covalente utilizând energia eliberată prin scindarea unor legături macroergice. Se va vedea mai departe în acest capitol că în sistemul actual de clasificare sunt şase clase de enzime, corespunzător celor şase tipuri fundamentale de reacţii.

Ca exemplu de tipuri particulare de reacţii pot fi considerate:

- hidroliza proteinelor în prezenţa proteazelor;

- fosforilări ale unor compuşi diverşi cu acid fosforic provenit din ATP, în prezenţa kinazelor;

- schimburi de grupări amino contra grupări carbonil între aminoacizi şi cetoacizi, catalizate de transaminaze.

O consecinţă a specificităţii de substrat este aceea că un anumit compus care poate fi transformat în mai mulţi produşi de reacţie, necesită pentru fiecare transformare o enzimă specifică; se exemplifică prin reacţiile pe care le suferă în organism glucozo-6-fosfatul (G-6-P):

$$\text{glucozo-6-fosfat} \xrightleftharpoons{\text{glucozo-6-fosfatizomeraza}} \text{fructozo-6-fosfat}$$

$$\text{glucozo-6-fosfat} \xrightleftharpoons{\text{fosfoglucomutaza}} \text{glucozo-1-fosfat}$$

$$\text{glucozo-6-fosfat} \xrightarrow{\text{glucozo-6-fosfatdehidrogenaza}} \text{acid-6-fosfogluconic}$$

$$\text{glucozo-6-fosfat} + H_2O \xrightarrow{\text{glucozo-6-fosfataza}} \text{glucoza + acid fosforic}$$

II.3.2 SPECIFICITATE DE SUBSTRAT

Aceasta constă în aria mai restrânsă sau mai largă de acţiune a fiecărei enzime cu o anumită specificitate de reacţie. Ea poate fi:

- absolută, dacă enzima catalizează un anumit tip de reacţie la un singur substrat;
- de grup, dacă enzima catalizează acelaşi tip de reacţie la două sau la un număr restrâns de substrate;
- specificitate largă, dacă enzima catalizează acelaşi tip de reacţie la un număr foarte mare de substrate.

Două dintre enzimele cu specificitate absolută sunt anhidraza carbonică şi ureaza:

$$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{anhidraza carbonică}} H_2CO_3$$

$$H_2N - CO - NH_2 + H_2O \xrightarrow{\text{urează}} 2NH_3 + CO_2$$

Alcooldehidrogeneza este un exemplu de enzimă cu specificitate de grup; ea catalizează transformarea prin dehidrogenare a alcoolilor monohidroxilici inferiori (şi chiar a unor alcooli dihidroxilici) în aldehidele corespunzătoare:

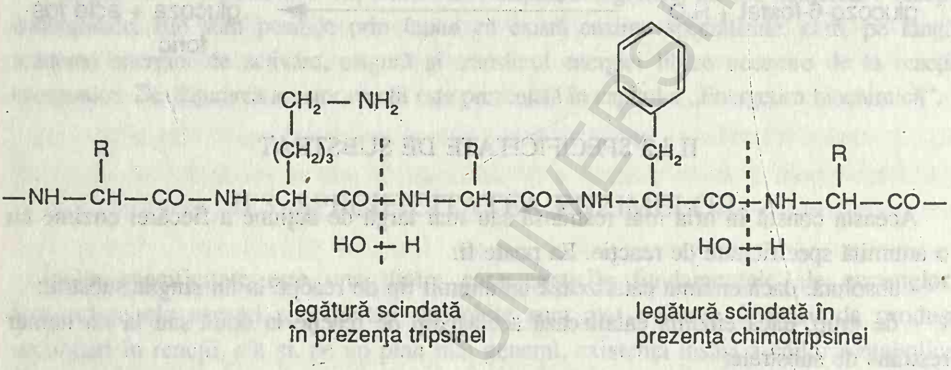
$$R - CH_2 - OH + NAD^+ \xrightarrow{\text{alcooldehidrogeneza}} R - CHO + NADH + H^+$$

Substratul preferat pentru alcool - DH este alcoolul etilic, acţiunea catalitică fiind mult mai redusă în cazul alcoolului metilic, propilic, etilenglicolului etc.

În reacţia de mai sus NAD^+ şi $NADH + H^+$ sunt formele oxidată, respectiv redusă, ale coenzimei alcooldehidrogenezei (despre coenzime vezi în continuarea acestui capitol şi în capitolul „Vitamine şi coenzime").

Specificitatea largă este întâlnită la mai multe enzime, dar cel mai frecvent la hidrolaze. Între acestea sunt si proteazele digestive: pepsina, tripsina şi chimotripsina. Specificitatea largă a fiecăreia dintre ele constă în capacitatea de a cataliza scindarea hidrolitică a oricărei proteine din alimente. Dar acţiunea hidrolitică a fiecăreia în parte şi chiar acţiunea simultană a lor nu asigură hidroliza totală (până la aminoacizii componenţi) a vreuneia dintre proteinele din alimente.

Faptul se explică prin existenţa unei „specificităţi de legătură" care constă în aceea că fiecare dintre cele trei enzime asigură hidroliza în oricare proteină numai a anumitor legături peptidice. Astfel chimotripsina catalizează hidroliza legăturilor peptidice a căror grupare CO provine de la aminoacizii Phe, Tyr, Trp, în timp ce tripsina asigură hidroliza legăturilor peptidice a căror grupare CO derivă de la aminoacizii bazici (lizina, arginina); la fel de specific acţionează şi pepsina:

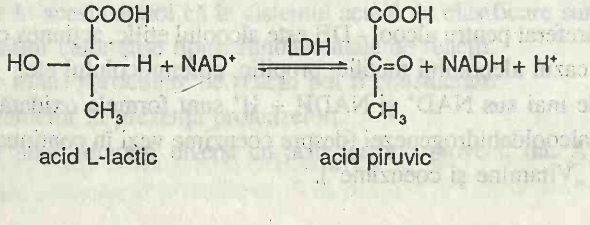


Pepsina, tripsina şi chimotripsina sunt endopeptidaze (acţionează pe legături peptidice din interiorul proteinelor). Există categoria de enzime proteolitice numite exopeptidaze (acţionează pe legături pepditice ale aminoacizilor N - terminali sau C - terminali); şi în cazul acestora există limitări impuse de specificităţile menţionate.

II.3.3 SPECIFICITATE STEREOCHIMICĂ

Majoritatea substratelor, chiar dintre cele mai simple, au atomi de carbon asimetrici şi deci se pot prezenta, raportat la glicerinaldehidă, în configuraţii absolute de tip D sau L (vezi proprietăţile glucidelor sau aminoacizilor).

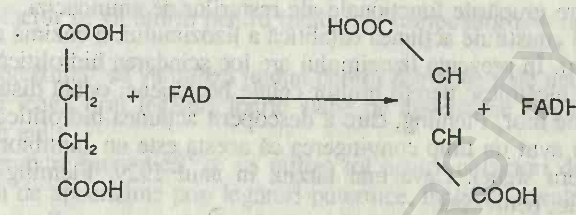
Stereospecificitatea constă în aceea că, după caz, enzima asigură transformarea fie numai a substratului cu configuraţie D, fie numai a substratului cu configuraţie L. De exemplu, lactat dehidrogeneza (LDH) catalizează numai oxidarea acidului L lactic la acid piruvic:



acid L-lactic — acid piruvic

Enzimele proteolitice prezentate mai înainte, dar şi enzimele ce catalizează alte transformări ale proteinelor, sunt stereospecifice în sensul că acţionează strict pe compuşii polipeptidici ce conţin L - aminoacizi aşa cum sunt proteinele naturale. Dimpotrivă, majoritatea enzimelor ce catalizează reacţii în căile metabolice ale glucidelor îşi manifestă acţiunea numai dacă acestea au configuraţie D.

Stereospecificitate au şi enzimele care catalizează transformări în care substratul sau produsul de reacţie prezintă izomeri geometrici. De exemplu, în reacţia de dehidrogenare a acidului succinic (una dintre reacţiile ciclului Krebs), catalizată de succinat dehidrogenază, se obţine strict acid fumaric (nici măcar urme de acid maleic):



acid succinic — acid fumaric

În această reacţie FAD şi $FADH_2$ sunt forma oxidată, respectiv redusă a unei alte coenzime.

Stereospecificităţile descrise, ca şi altele, sunt consecinţe ale interacţiei substratelor cu enzimele corespunzătoare la nivelul centrelor active ale acestora, aşa cum se va arăta în continuare.

II.4 STRUCTURA ENZIMELOR

II.4.1. ASPECTE GENERALE

Din studiul naturii chimice a câtorva mii de enzime cunoscute rezultă că ele sunt, cu foarte rare excepţii, proteine sau heteroproteine. Excepţiile, descoperite în ultimii zece ani, sunt enzime cu structură de acizi ribonucleici, iar ribonucleaza P este un complex proteină-acid ribonucleic; activitatea enzimatică a acesteia din urmă este datorată acidului ribonucleic şi nu proteinei. Una dintre teoriile formulate în legătură cu existenţa acestor enzime are în vedere următoarele: pe scara evolutivă, acizii nucleici au precedat proteinele şi alături de alte funcţii ei au îndeplinit-o şi pe aceea de enzime; când s-au sintetizat proteinele, acizii nucleici şi le-au ataşat pe acestea dobândind stabilitate şi unele activităţi crescute. Treptat însă, din motivele ce vor fi specificate, proteinele au preluat funcţia catalitică, ARN-ul fiind abandonat. De aceea enzimele cu structură de ARN, sau complexe ARN - proteine, sunt considerate drept „fosile biochimice".

Structura proteică şi heteroproteică a enzimelor este avantajoasă din mai multe motive: resturile de aminoacizi din proteine dispun de o mare varietate de grupări funcţionale care participă la legarea substratului cât şi la desfăşurarea catalizei; nici-o altă clasă de compuşi din lumea vie nu are varietatea de monomeri şi de grupări funcţionale pe care o au proteinele. În plus, enzimele sunt proteine globulare, ele au deci structură secundară, terţiară şi deseori structură cuaternară. Structurile secundară şi mai ales cea terţiară asigură posibilităţi multiple de constituire a centrelor active, zonele

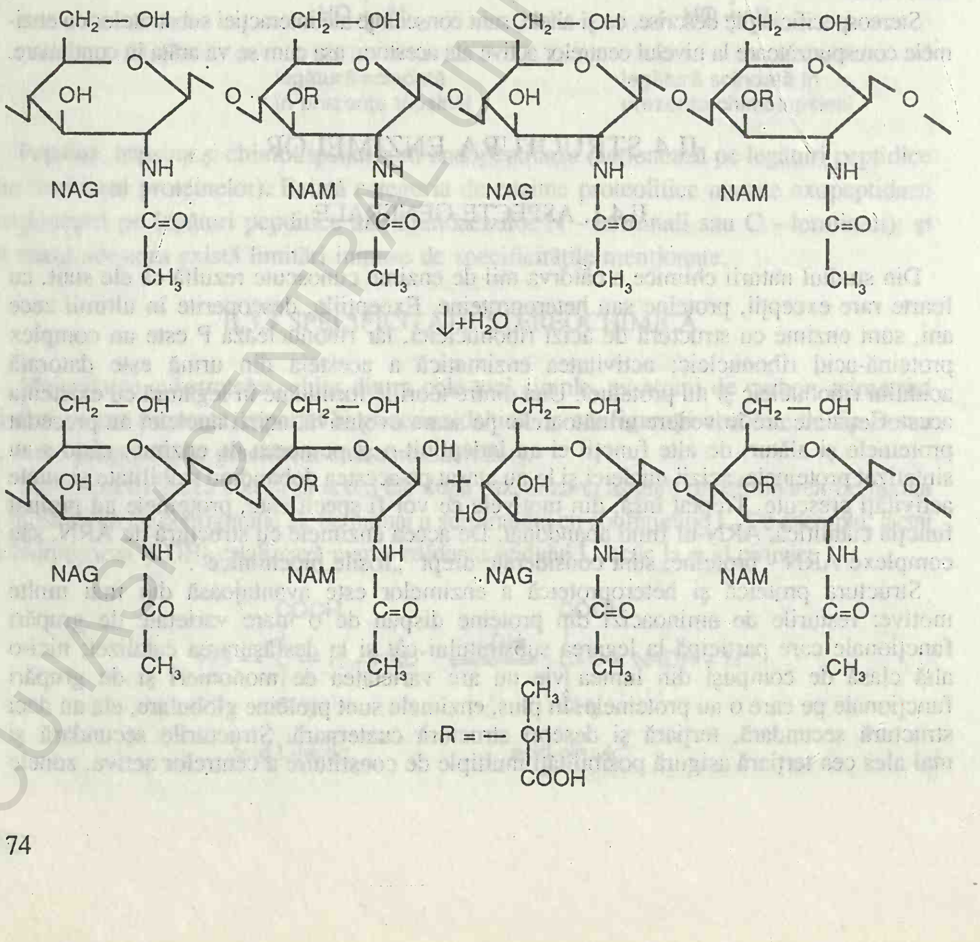
„fierbinţi" ale enzimelor, unde se desfăşoară reacţiile. Deosebit de importantă este existenţa la aprox. 10-20% dintre enzime a structurii cuaternare. Activitatea acestor enzime poate fi reglată (crescută, scăzută) prin diferiţi compuşi din mediu care produc mici modificări ale structurii cuaternare.

II.4.2. ENZIME CU STRUCTURĂ PROTEICĂ

Enzimele cu structură strict proteică sunt relativ puţine. Dintre cele 6 clase mari de enzime mai ales hidrolazele sunt proteine pure; exemple sunt ribonucleaza, chimotripsina şi lizozimul. În cazul acestor enzime atât legarea substratului cât şi cataliza în sine se realizează de către grupările funcţionale ale resturilor de aminoacizi.

Un exemplu îl constituie acţiunea catalitică a lizozimului, o enzimă aflată în mucusul nazal şi în lacrimi. În prezenţa lizozimului are loc scindarea hidrolitică a unor compuşi heterozidici care alcătuiesc pereţii multor celule bacteriene; odată distruşi aceşti pereţi, celulele bacteriene mor. Fleming, care a descoperit acţiunea hidrolitică a lizozozimului (în anul 1922), a avut un timp convingerea că acesta este un „antibiotic (compuşi de a căror existenţă era sigur). Ceva mai târziu, în anul 1929, Fleming a descoperit un adevărat antibiotic, penicilina.

Heterozidele din pereţii celulelor bacteriene sunt alcătuite din resturi de acid-N-acetil muramic (NAM) şi resturi de N-acetilglucozamină (NAG); hidroliza lor, catalizată de lizozim, este următoarea:



II.4.3. ENZIME CU STRUCTURĂ HETEROPROTEICĂ

Cele mai multe enzime au structură heteroproteică; ele sunt alcătuite din „apoenzimă" (componentă proteică) şi „cofactor" (componentă neproteică). Fiind molecule organice, cationi şi anioni (mai rar) ai elementelor; stabilitatea cofactorilor la acţiunea tempteraturii este mai mare decât a apoenzimelor.

De regulă, o enzimă are un singur cofactor; există totuşi şi enzime cu doi cofactori, diferiţi structural şi funcţional.

În privinţa terminologiei cofactorilor s-au făcut recent următoarele recomandări (ele urmăresc să elimine confuziile, destul de frecvente):

- termenul cofactor se va utiliza pentru totalitatea compuşilor neproteici din structura heteroenzimelor;
- termenul „coenzimă" se va utiliza numai pentru componentele neproteice de natură organică care se leagă prin legături foarte slabe de apoenzime (legături de hidrogen, ionice, hidrofobe etc.);
- termenul „grupare prostetică" se va utiliza tot pentru cofactori de natură organică dar care se leagă de apoenzime prin legături puternice, inclusiv covalente.

Numărul cofactorilor cunoscuţi este foarte mic în comparaţie cu numărul enzimelor cu structură heteroproteică. Faptul se explică prin aceea că un anumit cofactor este capabil să se asocieze cu diferite apoenzime rezultând astfel mai multe heteroenzime. Mai ales o parte dintre coenzime şi ioni au această capacitate. Există, de exemplu, câteva sute de enzime cu rol de hidrogenaze-dehidrogenaze a căror coenzimă este nicotinamid-adenin-dinucleotidul, notat NAD^+ (în forma oxidată). Ele pot acţiona simultan într-un compartiment celular dat care are o cantitate limitată de NAD^+, ca urmare a faptului că NAD^+ trece cu uşurinţă de pe o apoenzimă pe alta în funcţie de necesităţile de moment. De exemplu, alcool-dehidrogenaza şi lactatdehidrogenaza, ambele enzime citosolice (reacţiile catalizate au fost prezentate mai înainte) utilizează NAD^+ din fondul citosolic comun. Pe de altă parte, în timp ce în cursul reacţiilor de dehidrogenare de tipul celor catalizate de alcool dehidrogenază, NAD^+ trece în NADH + H^+ (forma redusă a coenzimei), în compartimentul celular dat (citosol) au loc simultan reacţii de hidrogenare a unor substrate în prezenţa unor enzime care utilizează forma redusă a coenzimei NADH + H^+. În condiţiile unui echilibru între reacţiile care generează şi cele ce utilizează NAD^+, se amplifică posibilitatea de funcţionare cu o cantitate limitată a acestei coenzime a unui număr foarte mare de hidrogenaze-dehidrogenaze. Situaţia este asemănătoare pentru enzimele cu coenzime $NADP^+$, FMN şi FAD.

Date ample privitoare la coenzime, care sunt derivaţi ai vitaminelor hidrosolubile, se află în capitolul „Vitamine şi coenzime". Alte date privind funcţia lor se află în subcapitolul „Centrul activ şi mecanismul de acţiune al enzimelor".

Dintre grupările prosteice, hemul este întâlnit cel mai frecvent în diverse enzime din organismul uman. Date despre structura şi funcţiile acestora se află în capitolele „Hemoproteine" şi „Energetica biochimică" (lanţul respirator).

O regulă generală reieşită din studiul unui mare număr de heteroenzime cu cofactori organici este că specificitatea lor este determinată în totalitate de apoenzime în timp ce coenzimele sunt grupările responsabile în cea mai mare parte de transformarea chimică propriuzisă.

Cum s-a mai arătat, cofactorii multor enzime sunt ioni metalici (metaloenzime). Legăturile dintre componentele proteice şi ionii metalici sunt de tip electrostatic. Stabilitatea complexelor este în funcţie de numărul şi intensitatea acestor interacţiuni; din studiul acestor complexe a mai reieşit că resturile aminoacizilor care eliberează

protoni (de exemplu, Glu, Asp, Ser) sau care au atomi de azot cu electroni neparticipanţi (inclusiv atomi de azot din legături peptidice) constituie liganzii pentru ionii metalici.

Dacă ionii metalici sunt disociaţi de apoenzimă, enzima îşi pierde complet sau îşi diminuă activitatea; de regulă disocierile sunt reversibile în sensul că ionul metalic poate fi reintegrat în componenta proteică.

În reacţiile catalizate de metaloenzime, ionii metalici îndeplinesc, de la caz la caz, roluri variate:

- stabilizează structura enzimei;
- participă la legarea substratului;
- induc unele modificări în conformaţia enzimei, cu efect asupra vitezei de reacţie;
- participă nemijlocit la cataliză, de exemplu în cazul multor reacţii de oxido-reducere.

În legătură cu structura enzimelor în general, a metaloenzimelor în particular, este de remarcat şi existenţa enzimelor omoloage (care catalizează aceeaşi reacţie în ţesuturi sau celule diferite, uneori chiar în compartimente diferite ale aceleiaşi celule). Asemenea situaţii s-au remarcat la enzime cum sunt aldolaza, piruvatcarboxilaza şi altele. În cazul metaloenzimelor diferenţa între enzimele omoloage poate fi la nivelul apoenzimei sau/şi a ionilor metalici; de exemplu, enzima superoxid-dismutază extrasă din mitocondrii conţine Mg^{2+} iar cea extrasă din citosol conţine Cu^{2+} şi Zn^{2+}.

Sunt şi enzime care necesită pentru activitatea lor simpla prezenţă în mediu a anumitor ioni, cationi sau anioni; exemple sunt prezenţa Ca^{2+} pentru activitatea lipazelor şi prezenţa Cl^{-} pentru activitatea amilazei salivare.

În tabelul II.1 se dau şi alte enzime care au în structură, sau necesită pentru activitate, diferiţi ioni.

Tabelul II.1

Enzime care conţin sau necesită prezenţa unor ioni

Enzime	*Ionul*
Citocromi Peroxidaze Catalaze	Fe^{2+} sau Fe^{3+}
Alcooldehidrogenază Anhidrază carbonică Carboxipeptidază	Zn^{2+}
Fosfohidrolază Fosfotransferaze	Mg^{2+}
Arginază	Mn^{2+}
Tirozinază Citocrom oxidază	Cu^{2+} sau Cu^{+}
Piruvatkinază	K^{+} şi Mg^{2+}
ATP-ază membranară	Na^{+}
Amilază salivară	Cl^{-}

II.5. SISTEME (COMPLEXE) MULTIENZIMATICE

Cercetările din ultimele decenii au evidenţiat că în cazul unor căi metabolice toate enzimele care catalizează reacţii individuale (sau numai o parte din ele) sunt asociate în formă de „complexe multienzimatice". În aceste complexe enzimele sunt fixate prin legături slabe, într-o ordine corespunzătoare intrării lor în acţiune, pe o proteină, „centrală" care poate fi chiar una dintre enzime (Fig. II.2.). Proteina centrală dispune de un „braţ" al cărui rol este următorul: fixează substratul S_1 şi îl duce la enzima E_1 care îl transformă în P_1; cum P_1 este în acest caz S_2, braţul îl preia şi îl duce la E_2 care îl transformă în P_2. La nivelul fiecărei enzime braţul îndeplineşte rol similar asigurând formarea produsului unic al tuturor enzimelor complexului. Avantajul este că braţul duce de fiecare dată S la E corespunzătoare potrivindu-l cu mare exactitate pe centrul activ, ceea ce asigură pe ansamblu o viteză mai mare decât cea corespunzătoare acţiunii enzimelor neasociate.

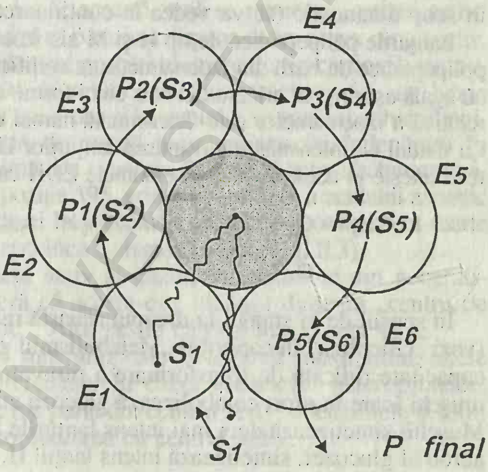


Fig. II.2 - Reprezentare intuitivă a structurii şi modului de funcţionare a unui complex multienzimatic cu şase enzime

Complexe multienzimatice bine cunoscute sunt „acid gras sintetaza" (vezi biosinteza acizilor graşi) şi „complexul piruvat dehidrogenază" (vezi degradarea oxidativă a glucozei).

II.6. IZOENZIME

O parte dintre enzimele care au şi structură cuaternară se prezintă sub mai multe forme moleculare. Pentru o enzimă dată, formele moleculare sub care ea apare se numesc izoenzime. Toate izoenzimele unei enzime catalizează aceeaşi reacţie; diferă doar viteza pe care fiecare o imprimă reacţiei unice.

Structural, izoenzimele unei enzime diferă prin raportul în care sunt asociate lanţurile polipeptidice de bază (subunităţile, monomerii), care, în acest caz sunt de cel puţin două tipuri. În cazul lactatdehidrogenazei (LDH) cele două lanţuri de bază sunt H (de la heart=inimă) şi M (de la muscle=muşchi). Cele cinci izoenzime ale LDH sunt tetrameri cu următoarele asocieri:

H_4	H_3M	H_2M_2	HM_3	M_4
(LDH_1)	(LDH_2)	(LDH_3)	(LDH_4)	(LDH_5)

Între lanţurile H şi M există foarte mici diferenţe din punctul de vedere al structurii primare în timp ce structurile secundară şi terţiară sunt atât de apropiate încât asocierile în oricare din variantele de mai sus se fac cu aceiaşi uşurinţă (evident, aceste asocieri se datorează formării de legături ionice, hidrofobe, de hidrogen etc.).

Cea mai mare parte a proprietăţilor fizico-chimice ale izoenzimelor unei enzime date sunt foarte apropiate. Diferenţe semnificative apar când unul din lanţurile de bază diferă de celălalt printr-un aminoacid dicarboxilic suplimentar sau aminoacid diaminic suplimentar. Se exemplifică tot prin LDH ale cărei izoenzime se diferenţiază prin sarcina electrică ca urmare a unei asemenea diferenţe de structura primară a celor două lanţuri de bază. Această însuşire a stat la baza separării electroforetice a izoenzimelor LDH; în prezent dozarea pe această cale a izoenzimelor LDH serice se practică curent în scop diagnostic (se va vedea în continuarea acestui capitol).

Lanţurile polipeptidice de tip H şi M ale izoenzimelor LDH, pe plan mai general lanţurile polipeptidice de bază din izoenzime, sunt codificate de gene diferite; în condiţiile asocierii lor cu egală uşurinţă în oricare din cele cinci forme izoenzimatice, într-o specie celulară proporţia relativă a izoenzimelor este determinată numai de intensitatea biosintezei celor două lanţuri. La rândul ei, intensitatea biosintezei lanţurilor H şi M este specifică fiecărui tip de celule. Se reaminteşte în acest sens că izoenzimele LDH catalizează reacţia:

$$CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - COOH + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3 - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - COOH + NAD^+$$

În sensul de la stânga la dreapta această reacţie încheie glicoliza în condiţii anaerobe (vezi „Glicoliza" în capitolul „Metabolismul glucidelor"). De aceea izoenzimele LDH cu capacitate ridicată de transformare a piruvatului în lactat sunt necesare, de exemplu în muşchi (care în efort catabolizează glucoza anaerob). Aceste izoenzime sunt M_4 şi M_3H. Muşchii sintetizează deci mai intens lanţurile M decât cele H. Inima, ţesut cu catabolism aerob al glucozei, sintetizează intens lanţul H, izoenzimele H_4 şi H_3M având o capacitate foarte redusă de transformare a piruvatului în lactat.

Creatinfosfokinaza sau creatinkinaza (notată CPK sau CK) are trei izoenzime. Lanţurile de bază care se asociază în acest caz sunt M (tot de la muscle) şi B (de la brain=creier); fiecare izoenzimă este un dimer, respectiv M_2, MB şi B_2. Şi aceste izoenzime se află în ser şi pot fi separate prin electroforeză.

În ţesuturi, izoenzimele îndeplinesc importante roluri reglatorii fiind sigur implicate şi în morfogeneză şi diferenţierea celulară.

II.7 CENTRUL ACTIV ŞI MECANISMUL DE ACŢIUNE AL ENZIMELOR

S-a arătat la începutul acestui capitol că în orice reacţie catalizată enzimatic formarea intermediară a complexului enzimă-substrat este obligatorie:

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

În prezent, există numeroase dovezi experimentale, directe sau indirecte, privitoare la formarea complexului ES. Într-un număr redus de cazuri enzima este legată de substrat prin legături puternice (covalente); astfel de complexe ES stabile au fost izolate şi analizate prin difracţia razelor X şi alte metode. Complexele în care legăturile dintre E şi S sunt slabe s-au studiat pe căi indirecte: saturând enzima cu substratul s-au obţinut modificări în spectrul de absorbţie, solubilitate, stabilitate termică etc. Mai nou, formarea complexelor ES este studiată

prin metoda marcajului chimic; ea constă în tratarea enzimelor izolate cu compuşi chimici care reacţionează în mod specific cu anumite grupări (aparţinând unor resturi aminoacide) la care se ataşează prin legături puternice (care nu se scindează la hidroliza enzimei). Dacă enzima marcată nu mai fixează S înseamnă că aminoacidul la care s-a ataşat compusul chimic este implicat în formarea complexului ES. Acest aminoacid poate fi recunoscut dacă se hidrolizează enzima, în hidrolizat apărând şi compexul aminoacid - compusul chimic.

O observaţie importantă în legătură cu formarea complexului enzimă substrat este că la anumite enzime îndepărtarea prin proteoliză a unor porţiuni din macromoleculele lor nu afectează (sau afectează în mică măsură) activitatea.

Aceste date experimentale corelate cu aceea că, de regulă, substratul este foarte mic în raport cu enzima, au permis formularea concluziei că numai o zonă restrânsă din enzimă participă la fixarea şi transformarea chimică a lui S; această zonă se numeşte „centrul activ" al enzimei". Tot din studii experimentale a rezultat că o enzimă dispune de un singur centru activ.

În centrele active ale enzimelor s-au evidenţiat grupări chimice de tip carboxil, amino, hidroxil şi tio; acestea aparţin unor resturi de aminoacizi cu caracter acid sau bazic (glutamic, aspartic, serina, tirozina, cisteina etc.), dar şi hetrociclii, în special al histidinei. Grupările sau resturile heterociclice aparţin de regulă unor aminoacizi îndepărtaţi în secvenţa (structura primară) a proteinei - enzimă. De exemplu, în centrul activ al chimotripsinei s-au identificat gruparea OH a serinei în poziţia 195, gruparea carboxil a acidului aspartic în poziţia 102 şi nucleul imidazolic al histidinei în poziţia 57. Grupările acestea sunt foarte apropiate în spaţiu ca urmare a conformaţiei specifice a chimotripsinei (Fig. II.3).

Sunt încă polemici în legătură cu centrul activ al enzimelor rezultate din generalizarea unor cazuri particulare; unii consideră că acesta este alcătuit dintr-un „centru de legare" şi, separat, dintr-un „centru catalitic". Alţii susţin că este mai corect să se considere că în centrul activ unele grupări sunt implicate în legarea substratului, altele asigură cataliza propriu-zisă, ele fiind intercalate. În cazul enzimelor heteroproteice, cofactorii reprezentaţi de grupări prostetice fac parte din centrul activ; coenzimele şi ionii metalici au o poziţionare care le asigură conlucrarea cu centrul activ.

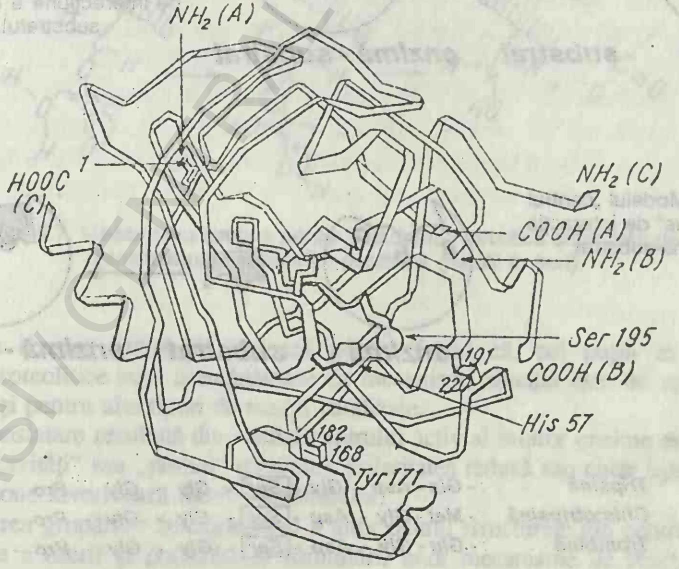


Fig. II.3. Structura terţiară a chimotripsinei: se evidenţiază resturile Ser-195 şi His-57 care împreună cu Asp-102 (dispus în apropiere) se află în centrul activ.

BCU IAŞI

În legătură cu organizarea spaţială a centrului activ al enzimelor (raportată la structura substratului) s-au elaborat două modele:

- Modelul clasic (Emil Fischer) consideră că potrivirea substratului cu centrul activ al enzimei este analoagă cu potrivirea „lacăt-cheie". Acest model presupune o rigiditate a structurii enzimei în zona centrului activ (Fig. II.4).

- Modelul Koshland, numit „centrul activ indus", presupune o flexibilitate a zonei în care aceasta se află. În enzima liberă centrul activ este „preformat" ceea ce înseamnă că el are o configuraţie spaţială uşor diferită de cea necesară fixării substratului. Substratul induce o modificare conformaţională a zonei centrului activ realizându-se configuraţia optimă fixării. În Fig. II.5. se redă una dintre reprezentările simplificate ale modelului Koshland.

În cazul unor enzime, formarea complexului ES în varianta Koshland a fost demonstrată experimental. Pe de altă parte, din punct de vedere termodinamic aşezarea cea mai potrivită a substratului în raport cu enzima reduce la minimum gradele de libertate în ceea ce priveşte translaţia şi rotaţia substratului, element ce favorizează atingerea uşoară a stării de tranziţie; aceasta este interpretarea dată scăderii energiei de activare în reacţiile catalizate de enzime. Specificitatea stereochimică şi mai ales inhibiţia competitivă a enzimelor pot fi explicate cu uşurinţă pe baza modelului Koshland.

Desigur că fiecare enzimă prezintă o structură specifică a centrului activ (cu stările „preformată" şi „indusă"). Aceasta nu exclude existenţa unor analogii în structurile centrelor active, cel puţin pentru enzime cu funcţie apropiată. Astfel o serie de enzime proteolitice au în centrul activ un rest de serină; mai mult, în vecinătatea restului de serină variaţia resturilor aminoacide este foarte redusă (Fig. II.6).

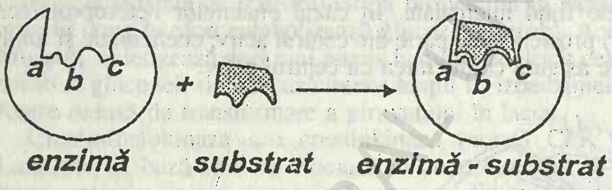
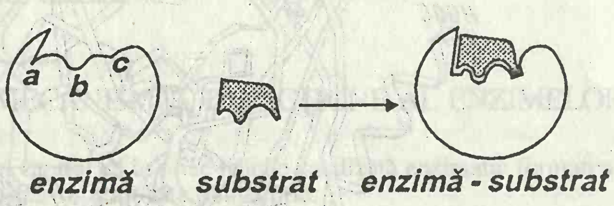


Fig. II.4. Modelul lacăt-cheie de interacţiune a enzimei cu substratul.

Fig. II.5. Modelul „centrul activ indus" de interacţie enzimă-substrat.



Tripsină	*: - Gln - Asp - Gly - [Ser] - Gly - Gly - Pro -*
Chimotripsină	*: - Met - Gly - Asp - [Ser] - Gly - Gly - Pro -*
Trombină	*: - Glu - Gly - Asp - [Ser] - Gly - Gly - Pro -*

Fig. II.6. Secvenţa aminoacizilor în zona centrului activ al unor enzime proteolitice este apropiată.

BCU IASI / CENTRAL

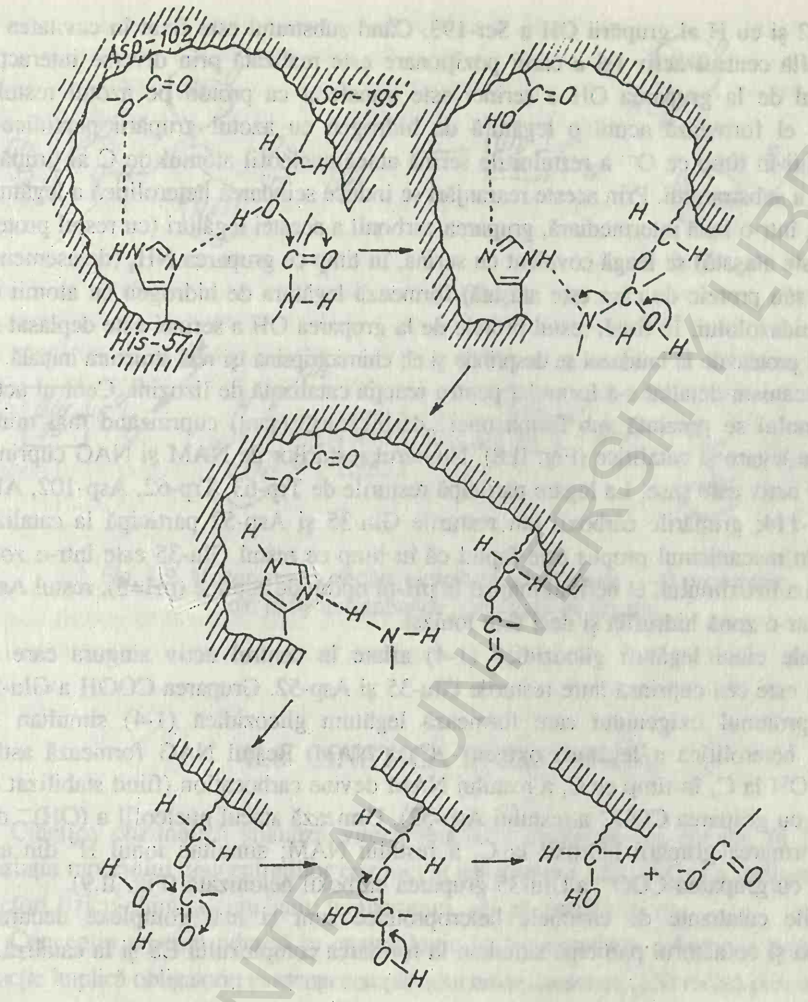


Fig. II.7. Mecanismul propus pentru scindarea hidrolitică catalizată de chimotrpsină a legăturilor peptidice (detalii în text).

Existenţa acestor omologii pledează pentru faptul că, cel puţin în linii mari, scindările proteolitice sunt asemănătoare ca mecanism; situaţia este de aşteptat să se întâlnească şi pentru alte tipuri de reacţii catalizate.

O altă constatare rezultată din studiul centrului activ al multor enzime este că acesta se află în „cavităţi" sau „şanţuri" (crevase); polaritatea redusă sau chiar lipsa polarităţii din aceste zone favorizează fixarea substratelor.

Cunoaşterea grupărilor funcţionale şi a altor detalii structurale ale centrului activ al unor enzime a oferit şi posibilitatea formulării unor mecanisme de reacţie. În cazul chimotripsinei (Fig. II.7), se presupune că în lipsa substratului imidazolul restului His-57 interacţionează prin legături de H cu unul dintre atomii de oxigen ai grupării COOH

a Asp-102 şi cu H al grupării OH a Ser-193. Când substratul este fixat în cavitatea în care se află centrul activ (şi a cărui poziţionare este realizată prin diverse interacţii) hidrogenul de la gruparea OH a serinei este transferat ca proton pe azotul restului imidazol; el formează acum o legătură de hidrogen cu azotul grupării peptidice a substratului în timp ce O^- a restului de serină atacă nucleofil atomul de C al grupării peptidice a substratului. Prin aceste rearanjări se induce scindarea heterolitică a legăturii peptidice; într-o fază intermediară, gruparea carbonil a acestei legături (cu restul proteic de care este ataşată) se leagă covalent cu serina, în timp ce gruparea NH_2 (de asemenea cu restul său proteic de care este ataşată) formează legătura de hidrogen cu atomii de azot ai imidazolului. În final, restul proteic de la gruparea OH a serinei este deplasat de apă, restul proteic de la imidazol se desprinde şi el; chimiotripsina îşi reia structura iniţială.

Un mecanism detaliat s-a formulat pentru reacţia catalizată de lizozim. Centrul activ al lizozimului se prezintă sub forma unei „despicături" (şanţ) cuprinzând mai multe grupări de legare şi catalitice (Fig. II.8). Numărul resturilor de NAM şi NAG cuprinse în centrul activ este şase. La legare participă resturile de Trp-63, Trp-62, Asp-102, Ala-107, Arg-114; grupările carboxil din resturile Glu-35 şi Asp-52 participă la cataliză. Esenţial în mecanismul propus este faptul că în timp ce restul Glu-35 este într-o zonă hidrofobă a lizozimului, el nefiind ionizat la pH-ul optim de acţiune (pH=5), restul Asp-52 este într-o zonă hidrofilă şi deci este ionizat.

Din cele cinci legături glicozidice (1-4) aflate în centrul activ singura care se scindează este cea cuprinsă între resturile Glu-35 şi Asp-52. Gruparea COOH a Glu-35 cedează protonul oxigenului care formează legătura glicozidică (1-4) simultan cu scindarea heterolitică a legăturii oxigen - C_1 a NAM. Restul NAG formează astfel gruparea OH la C_4 în timp ce C_1 a restului NAM devine carbocation (fiind stabilizat de interacţia cu gruparea COO^- a restului Asp-52). Urmează atacul nucleofil a $(OH)^-$ din apă cu formarea grupării hidroxil la C_1 a restului NAM; simultan ionul H^+ din apă formează cu gruparea COO^- a Glu-35 gruparea carboxil neionizată (Fig. II.9).

Reacţiile catalizate de enzimele heteroproteice sunt şi mai complexe deoarece apoenzima şi cofactorul participă simultan la formarea complexului ES şi la cataliză.

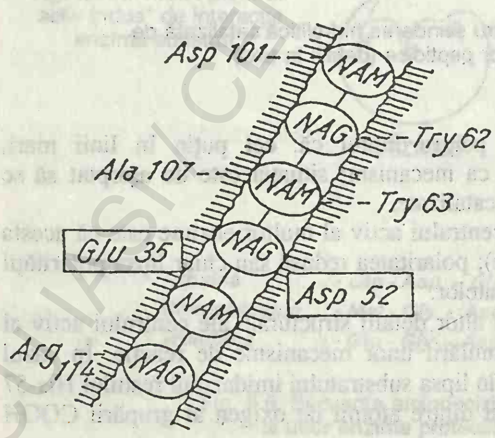


Fig. II.8. Reprezentarea intuitivă a centrului activ al lizozimului (comentariu în text).

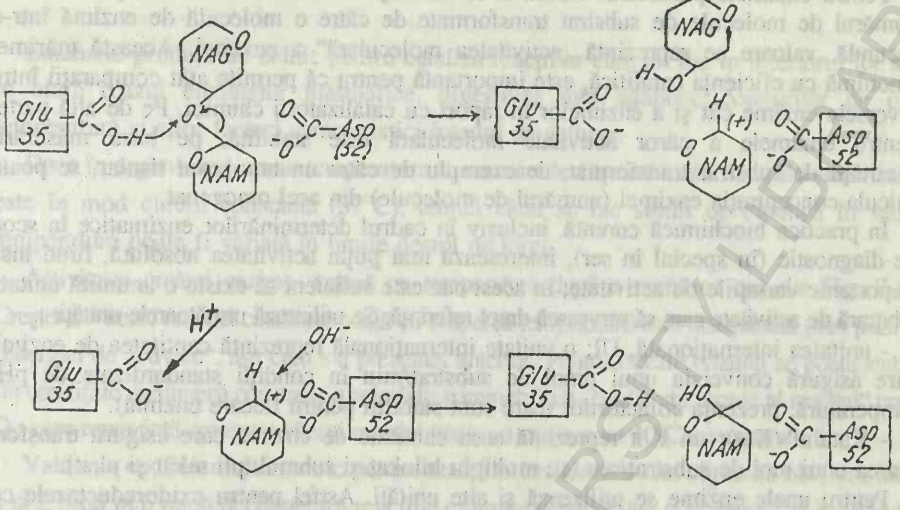


Fig. II.9. Mecanismul scindării hidrolitice a legăturilor (1-4) glicozidice din heteropolizaharide, catalizată de lizozim.

II.8. CINETICA ENZIMATICĂ

Cinetica enzimatică studiază viteza reacţiilor catalizate de enzime în funcţie de variaţia raportului concentraţiilor enzimei şi substratului ([E], [S]) şi a influenţelor unor factori fizico-chimici cum sunt: temperatura, pH-ul, inhibitorii etc.

Concepţia unanim admisă în enzimologie că formarea din substrat a produsului de reacţie implică obligatoriu existenţa complexului enzimă-substrat (ES) redată prin ecuaţia:

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

a fost statuată în primul rând în legătură cu cinetica reacţiilor catalizate de enzime; de aceea, în interpretarea fiecăruia dintre aspectele cuprinse în acest subcapitol punctul de plecare îl reprezintă chiar această ecuaţie.

II.8.1. EXPRIMAREA VITEZEI REACŢIILOR ENZIMATICE. ACTIVITATEA ENZIMELOR

Utilizarea curentă în cinetica enzimatică a acestor termeni face necesară definirea lor.

Viteza de reacţie se exprimă prin cantitatea de substrat transformată în produs de reacţie (exprimată în miligrame, mai rar în grame) într-o unitate de timp (secundă, minut).

Pentru enzimele purificate, cărora li se cunoaşte masa moleculară se poate stabili numărul de molecule de substrat transformate de către o moleculă de enzimă într-o secundă, valoare ce reprezintă „activitatea moleculară“ a enzimei. Această mărime, sinonimă cu eficienţa catalitică, este importantă pentru că permite atât comparaţii între diversele enzime cât şi a enzimelor în raport cu catalizatorii chimici. Pe de altă parte, pentru enzimele a căror activitate moleculară este stabilită, pe baza măsurării cantităţii de substrat transformat, de exemplu de către un omogenat tisular, se poate calcula concentraţia enzimei (numărul de molecule) din acel omogenat.

În practica biochimică curentă, inclusiv în cadrul determinărilor enzimatice în scop de diagnostic (în special în ser), interesează mai puţin activitatea absolută, fiind însă importante variaţiile de activitate; în acest caz este suficient să existe o anumită unitate arbitrară de activitate care să servească drept referinţă. Se utilizează următoarele unităţi:

- unitatea internaţională, UI; o unitate internaţională reprezintă cantitatea de enzimă care asigură conversia unui µmol de substrat/min în condiţii standardizate de pH, temperatură, prezenţa cofactorilor (care sunt stabiliţi pentru fiecare enzimă).
- Katalul (Kat); un Kat reprezintă acea cantitate de enzimă care asigură transformarea unui mol de substrat/sec (cu multiplu kilokat şi submultipli mkat şi µkat).

Pentru unele enzime se utilizează şi alte unităţi. Astfel pentru oxidoreductazele cu coenzime NAD^+ ($NADH + H^+$) sau ($NADPH + H^+$) activitatea se exprimă prin creşterea sau scăderea extincţiei la 340 nm formele reduse ale enzimelor absorbind această radiaţie, în timp ce formele oxidate nu o absorb; o unitate enzimatică pentru aceste hidrogenaze-dehidrogenaze reprezintă creşterea sau scăderea cu **0,001** a extincţiei la 340 nm într-un minut (cuva de 1 cm).

Pentru fosfatazele din ser se utilizează unitatea Bodansky care reprezintă cantitatea de enzimă ce formează, prin hidroliza esterilor fosforici, un mg de fosfat anorganic (în condiţii standardizate de pH, temperatură).

II.8.2. VITEZA INIŢIALĂ A REACŢIILOR ENZIMATICE

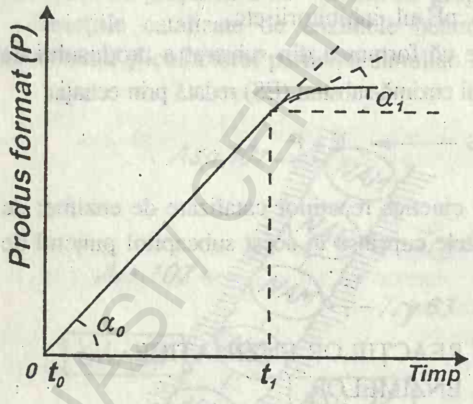


Fig. II.10. Determinarea vitezei iniţiale (v_o) a unei reacţii enzimatice.

Dacă unui substrat aflat în soluţie i se adaugă o cantitate de enzimă care catalizează transformarea acelui substrat se constată că formarea în timp a produsului P are loc după o curbă ca cea din Fig. II.10. Ea are o porţiune rectilinie (cu panta constantă), apoi se înclină şi în final se aplatizează. Este necesar ca în măsurătorile de cinetică să se ia valoarea notată v_0, numită viteza iniţială şi care reprezintă viteza reacţiei pe porţiunea rectilinie. Datorită concentraţiei mari a substratului corespunzătoare acestei porţiuni, ES se transformă numai în E + P (nu şi în E + S). În practică se determină viteza reacţiei în primele secunde (sau minute pentru reacţii lente) şi aceasta se consideră v_0.

II.8.3. INFLUENŢA PH-ULUI ŞI TEMPERATURII ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

Enzimele produse de celule pentru cataliza reacţiilor care au loc în interiorul lor sau în afară (cazul enzimelor plasmatice, digestive) sunt adaptate condiţiilor de pH, temperatură şi altor factori caracteristici locului de acţiune.

Dacă în organismul uman temperatura la care se desfăşoară toate reacţiile enzimatice este în mod curent constantă (37°C), atunci când se fac studii de cinetică în vitro, temperatura poate fi variată în limite destul de largi.

Activitatea oricărei enzime variază cu temperatura după o curbă ca cea din Fig. II.11. Creşterea vitezei reacţiei catalizate odată cu creşterea temperaturii este interpretată prin prisma „energiei de activare", aşa cum s-a prezentat anterior. Pentru fiecare enzimă se poate stabili (în condiţiile menţinerii constante a celorlalţi parametri) un „coeficient termic al reacţiei" notat Q_{10} care reprezintă creşterea vitezei reacţiei pentru o creştere cu 10°C a temperaturii.

Valoarea coeficientului termic pentru reacţiile enzimatice este cuprinsă obişnuit între 1 şi 2 fiind mai mică decât pentru reacţiile chimice necatalizate (Q_{10} între 2 şi 4). Relaţia este valabilă numai până la o anumită temperatură numită temperatura optimă, t_{opt}, pentru care viteza atinge valoarea maximă. Peste t_{opt} viteza reacţiei scade brusc datorită denaturării termice a apoenzimei (constând mai ales în ruperea legăturilor de hidrogen), fiind afectat şi centrul activ. T_{opt} pentru enzimele din organismul uman este între 40-50°C. Există enzime, în alte sisteme vii, a căror t_{opt} este mai ridicată (la plante 50-60°C, chiar 80-100°C la enzime din microorganisme care trăiesc în ape termale).

Când se determină activităţile unor enzime în scop diagnostic (de exemplu activitatea enzimelor plasmatice), este obligatoriu ca aceasta să se facă la o temperatură fixă, în cazul celor mai multe dintre ele 37°C.

Influenţa temperaturii asupra activităţii enzimelor este foarte importantă în criobiologie; un caz îl constituie conservarea la temperaturi scăzute a organelor în vederea transplantului.

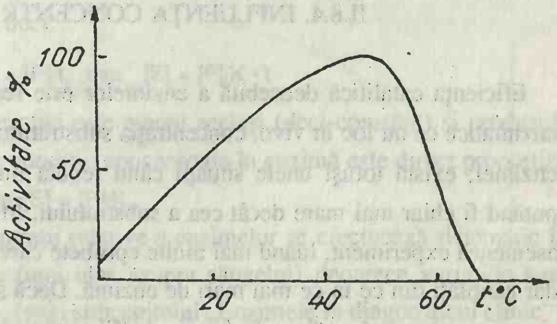


Fig. II.11. Variaţia activităţii enzimelor în funcţie de temperatură.

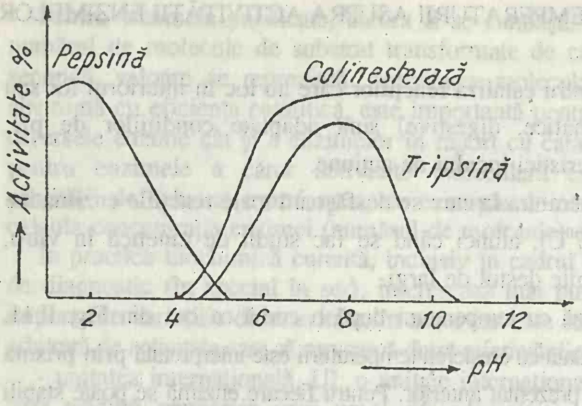


Fig. II.12. Variația activității unor enzime în funcție de pH.

Viteza reacțiilor enzimatice este influențată, de asemenea, de pH. Pentru enzimele din organismul uman pH-ul optim de acțiune este chiar pH-ul normal al mediului în care ele își îndeplinesc funcția catalitică (cazul pepsinei și tripsinei din Fig. II.12.).
Cum în majoritatea țesuturilor din organism pH-ul este în jur de 7 și enzimele au acțiune optimă în apropierea acestei valori.

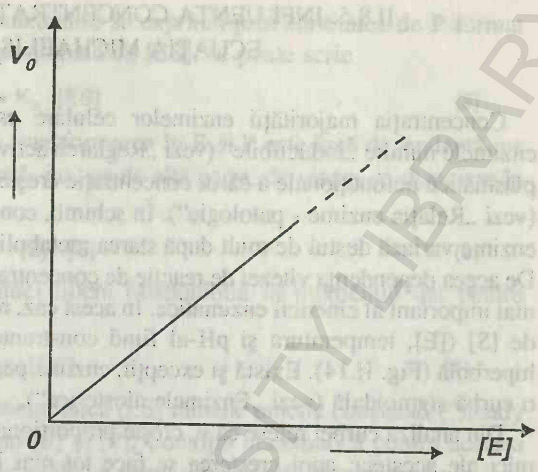
Diminuarea vitezei reacției enzimatice la valori de pH mai mici sau mai mari decât cel optim se realizează în mod specific pentru fiecare enzimă. Între multiplele acțiuni ale ionilor H^+ și OH^- asupra enzimelor se menționează în primul rând efectul lor denaturant; spre deosebire de efectul denaturant al temperaturii, în acest caz se rup mai ales legăturile de tip electrovalent. La enzimele în al căror centru activ se află grupări ionizabile, acide sau bazice, acesta interacționează direct cu ionii H^+ și OH^-, rezultatul fiind creșterea sau scăderea gradului lor de disociere; ionii H^+ și OH^- acționează în acest caz ca adevărați inhibitori (vezi mai departe inhibiția activității enzimelor).

Un exemplu de acțiune a pH-ului asupra enzimei îl constituie inactivarea la nivelul stomacului (pH 1-2) a amilazei salivare (pH optim 6,6-6,8) care este antrenată cu alimentele din cavitatea bucală.

II.8.4. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI ENZIMEI

Eficiența catalitică deosebită a enzimelor este responsabilă de faptul că în reacțiile enzimatice ce au loc în vivo, concentrația substratului este mult superioară concentrației enzimei; există totuși unele situații când regula nu se respectă, concentrația enzimei putând fi chiar mai mare decât cea a substratului. În vitro este foarte ușor să se facă un asemenea experiment, luând mai multe eprubete care conțin aceeași cantitate de substrat dar cantități din ce în ce mai mari de enzimă. Dacă se determină v_o pentru fiecare probă și apoi se reprezintă grafic v_o în funcție de [E] se obține o dreaptă ca cea din Fig. II.13.

Fig. II.13. Variaţia vitezei unei reacţii enzimatice în funcţie de concentraţia enzimei.



Matematic, această linearitate se exprimă prin relaţia:

$$v_o = K \cdot [E]$$

unde K este o constantă caracteristică pentru fiecare sistem enzimă-substrat.

Creşterea lineară a vitezei se explică prin formarea complexului ES în dependenţă doar de [E], în aceste condiţii complexul transformându-se integral în produs de reacţie.

În această reprezentare, la o concentraţie a enzimei egală cu zero, $v_o = 0$, sugerând că reacţia nu se desfăşoară deloc în lipsa enzimei. Totuşi reprezentarea este corectă pentru că în practica enzimatică curentă v_o în lipsa E se scade din v_o în prezenţa ei (se face un aşa numit „blanc“ reprezentând tocmai valoarea lui v_o în lipsa lui E care se scade din valoarea v_o a fiecărei probe).

Proporţionalitatea între viteza v_o şi [E] are importante aplicaţii practice: de exemplu, este posibil să se estimeze concentraţia relativă a unei enzime în omogenate celulare fără a fi necesar să se efectueze o purificare prealabilă a acesteia. Pe de o parte, $v_o = K \cdot [E]$, iar pe de altă parte $v_o = [P]/t$ (unde [P] = concentraţia produsului reacţiei, t = timpul de desfăşurare al reacţiei); deci:

$$K \cdot [E] = [P]/t \quad \text{sau} \quad [E] = [P]/K \cdot t$$

Dacă timpul pentru studierea reacţiei este mereu acelaşi (deci constant) şi produsul $K \cdot t$ = constant (notat K_1); în aceste condiţii, concentraţia în enzimă este direct proporţională cu cantitatea de produs format $[E] = [P]/K_1$.

Asemenea măsurători de concentraţii relative a enzimelor se efectuează sistematic în laboratoarele de analize medicale (mai ales asupra sângelui) deoarece variaţiile sunt corelate cu diferite stări patologice, (vezi subcapitolul „Enzimele în diagnosticul clinic“).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.8.5. INFLUENŢA CONCENTRAŢIEI SUBSTRATULUI. ECUAŢIA MICHAELIS-MENTEN

Concentraţia majorităţii enzimelor celulare este constantă în timp; fac excepţie enzimele numite „inductibile“ (vezi „Reglarea activităţii enzimelor“) precum şi enzimele plasmatice nefuncţionale a căror concentraţie creşte sau scade în anumite stări patologice (vezi „Relaţia enzime - patologie“). În schimb, concentraţia substratelor celor mai multe enzime variază destul de mult după starea metabolică a ţesutului şi numeroşi alţi factori. De aceea dependenţa vitezei de reacţie de concentraţia substratului constituie aspectul cel mai important al cineticii enzimatice. În acest caz, reprezentarea grafică a lui v_o în funcţie de [S] ([E], temperatura şi pH-ul fiind constrante) conduce la o curbă cu aspect de hiperbolă (Fig. II.14). Există şi excepţii, enzime pentru care în loc de hiperbolă se obţine o curbă sigmoidală (vezi „Enzimele alosterice“).

Din analiza curbei reiese că v_o creşte proporţional cu creşterea [S] numai pentru valori mici ale acesteia; apoi creşterea se face tot mai lent pentru ca dincolo de punctul B, oricât de mult ar creşte [S], viteza reacţiei rămâne constantă; valoarea constantă a vitezei este şi valoarea maximă, notată V_{max}.

Explicaţia alurei curbei precum şi o ecuaţie în care v_o se exprimă în funcţie de [S], V_{max} şi o constantă K_M, se datorează lui Michaelis şi Menten.

În deducerea ecuaţiei se pleacă de la:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_3} E + P \qquad (1)$$

În completare la cele menţionate anterior în legătură cu această ecuaţie generală se precizează că transformarea ES $\longrightarrow$ E + P este de regulă ireversibilă din două motive: pe de o parte, este etapa mai lentă, pe de altă parte, P devine, în cadrul căii metabolice specifice, substrat pentru reacţia următoare şi deci se consumă rapid (există totuşi reacţii enzimatice în care reformarea lui ES din E şi P nu poate fi neglijată).

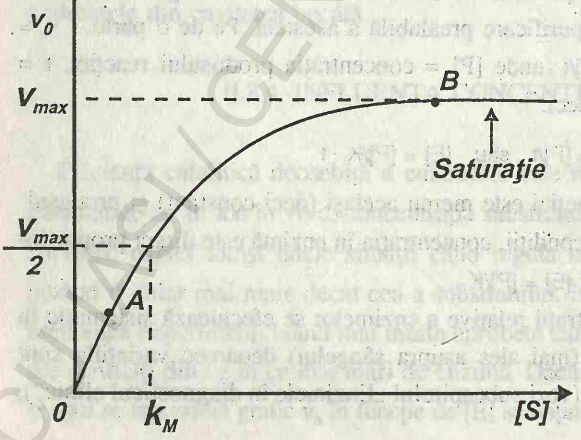


Fig. II.14. Variaţia vitezei reacţiei enzimatice în funcţie de concentraţia substratului.

Deoarece viteza reacţiei catalizată enzimatic se exprimă prin cantitatea de P format într-o unitate de timp, iar [P] este proporţională cu [ES], se poate scrie

$$v_o = K_3 \cdot [ES] \quad (2)$$

Cantitatea de ES disponibilă pentru transformarea în E şi P este însă dependentă, pe de o parte, de viteza cu care se formează, iar, pe de altă parte, de viteza de disociere în E şi S; aceste viteze sunt redate prin:

- viteza de formare a lui $ES = K_1 \cdot [E] \cdot [S]$ (3)

unde [E] reprezintă concentraţia enzimei libere (disponibilă în momentul dat pentru formarea ES);

- viteza de disociere a lui $ES = k_2 \cdot [ES]$ (4)

Dacă reacţia face parte dintr-o cale metabolică [ES] rămâne practic constantă ("steady state", stare staţionară) şi variază numai [S] şi [P]. Condiţia matematică pentru aceasta este ca viteza de formare a lui ES să fie egală cu suma vitezelor de transformare în E şi P şi refacere a lui E + S, deci:

$$K_1 \cdot [E] \cdot [S] = (K_2 + K_3) \cdot [ES] \quad (5)$$

sau:

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (6)$$

Raportul constantelor este tot o constantă, notată K_M, deci:

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (7)$$

care poate fi scrisă şi sub forma:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M} \quad (8)$$

Deci pentru calculul pe baza ecuaţiei (7) a lui K_M, care are o deosebită importanţă în enzimologie, este necesară măsurarea directă a lui [E] şi [ES]. Aceste determinări sunt deseori dificile; de aceea se urmăreşte obţinerea unei ecuaţii în care K_M să fie corelat cu parametri mai uşor măsurabili. În acest scop [E] se exprimă prin:

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (9)$$

unde $[E_T]$ este concentraţia totală a enzimei în mediu.

Substituind pe [E] din (9) în (8) se obţine:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{K_M} \quad (10)$$

care prin rezolvare conduce la:

$$[ES] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

Substituind această valoare a lui ES în (2), se obţine:

$$V_O = \frac{K_3[E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]} \tag{12}$$

Cum s-a arătat, când concentraţia substratului este mare (caz frecvent în vivo), viteza reacţiei este V_{max} ceea ce presupune participarea în totalitate a enzimei la reacţie, deci:

$$V_{max} = K_3 [E_T] \tag{13}$$

Substituind în (12), se obţine:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \tag{14}$$

Aceasta este ecuaţia Michaelis-Menten sau ecuaţia de viteză a reacţiilor enzimatice cu un singur substrat. Ea redă deci variaţia lui v_o în funcţie de variaţia lui [S]; în ecuaţie mai apar constanta K_M şi V_{max} (care exprimă indirect concentraţia enzimei).

Concordanţa ecuaţiei cu alura curbei din Fig. II.14 este excepţională; pentru verificare se dau două situaţii:

a. Când S are concentraţia foarte mică (corespunzător porţiunii O - A pe curbă), valoarea lui la numitor poate fi neglijată şi ecuaţia (14) devine:

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_M} \approx K \cdot [S] \tag{15}$$

adică v_o este direct proporţională cu [S];

b. Când S are concentraţia foarte mare în raport cu K_M (corespunzător punctului B pe curbă), valoarea acesteia din urmă poate fi neglijată, deci:

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{[S]} \approx V_{max} \tag{16}$$

adică v_o atinge valoarea maximă.

II.8.6. DETERMINAREA EXPERIMENTALĂ A K_M; SEMNIFICAŢIA ACESTEI CONSTANTE. CONSTANTA CATALITICĂ, K_{cat}

Fiecare enzimă se caracterizează printr-o valoare particulară a K_M; această valoare se determină în principiu astfel: se prepară o serie de 6-10 probe (într-o soluţie tampon potrivită) introducându-se în toate aceeaşi cantitate de enzimă dar realizându-se un gradient crescător al substratului. Reacţia, declanşată în momentul amestecării enzimei cu substratul, este lăsată să se desfăşoare un anumit timp (secunde, minute, după caz) apoi este întreruptă prin adaosul unui inhibitor potrivit. Se măsoară în fiecare probă cantitatea de produs format; cu aceste date se calculează valorile v_o care se reprezintă grafic în funcţie de [S] crescător. Se obţine curba hiperbolică caracteristică (Fig. II.14). Porţiunea dreaptă paralelă cu abscisa (corespunzătoare saturării E cu S) se prelungeşte până la intersecţia cu ordonata; intersecţia reprezintă V_{max}. Se ia valoarea $V_{max}/2$, se duce o dreaptă paralelă cu abscisa până la intersecţia cu curba şi de aici se duce o dreaptă paralelă cu ordonata până la intersecţia cu abscisa, care este chiar K_M.

Dacă în ecuaţia Michaelis-Menten se substituie v_o cu $V_{max}/2$ se obţine succesiv:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad 2[S] = K_M + [S] \qquad K_M = [S] \qquad (17)$$

Se trage concluzia: K_M reprezintă acea concentraţie a substratului pentru care viteza reacţiei este jumătate din V_{max}; în consecinţă valorile lui K_M se dau în moli/litru.

Semnificaţia lui K_M reiese dacă se apelează la formula (6): $K_M = (K_2 + K_3)/K_1$; considerând $K_3 << K_1$ se obţine $K_M = K_2/K_1$ şi deci „K_M redă capacitatea de disociere a lui ES în E + S"; în alţi termeni, ea redă tăria legăturii între E şi S în complexul ES. Valorile lui K_M pentru diverse enzime sunt cuprinse între 10^{-1} - 10^{-6} moli/litru.

Se conchide:

- valorile mici ale K_M corespund unei legături slabe între E şi S;
- valorile mari ale K_M corespund unei legături puternice între E şi S.

În cinetica enzimatica se utilizează şi o altă constantă, notată K_{cat} care se defineşte prin raportul:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]} \qquad (18)$$

Ea redă numărul de transformări substrat → produs pe care fiecare centru activ le catalizează într-o unitate de timp (turnover). Cunoscând valorile şi semnificaţiile lui K_M şi K_{cat} se poate calcula K_{cat}/K_M care redă eficienţa catalitică a enzimei (Tabelul II.2).

Tabelul II.2

Valorile K_M, K_{cat} şi K_{cat}/K_M ale câtorva enzime în raport cu substratele

Enzima	*Substratul*	*K_M(M)*	*K_{cat}(s^{-1})*	*K_{cat}/K_M*
Acetilcolinesterază	Acetilcolină	$9,5 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{4}$	$1,5 \times 10^{8}$
Anhidrază carbonică	CO_2	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{6}$	$8,3 \times 10^{7}$
Anhidrază carbonică	HCO_3^-	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{5}$	$1,5 \times 10^{7}$
Catalază	H_2O_2	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{7}$	$4,0 \times 10^{8}$
Chimotripsină	Esterul etilic al N-acetil-glicinei	$4,4 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$
Fumarază	Fumarat	$5,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{2}$	$1,6 \times 10^{8}$
Urează	Uree	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{4}$	$4,0 \times 10^{5}$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.8.7. ECUAŢIA LINEWEAVER-BURK

Matematic, ecuaţia Michaelis-Menten poate fi transformată în moduri variate. O variantă, datorată lui Lineweaver şi Burk, este forma reciprocă:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (19)$$

Variabilele fiind [S] şi v_o, ecuaţia este de forma generală y = ax + b; reprezentând grafic $1/v_o$ în funcţie de $1/[S]$ se obţine o dreaptă (Fig. II.15). Intersecţia dreptei cu ordonata corespunde valorii $1/V_{max}$, iar panta dreptei este dată de K_M/V_{max}. Dacă se prelungeşte dreapta până la intersecţia cu abscisa, se obţine valoarea $-1/K_M$. Din punctul de vedere al determinării experimentale a lui K_M şi V_{max} reprezentarea lui $1/v_o$ în funcţie de $1/[S]$ este avantajoasă, numărul de probe necesare pentru obţinerea dreptei (şi deci a lui V_{max} şi K_M) fiind mult mai mic în comparaţie cu numărul de probe necesare obţinerii hiperbolei. Pe de altă parte, ecuaţia lui Lineweaver şi Burk este extrem de utilă în studii de inhibiţie a activităţii enzimelor prin compuşi chimici.

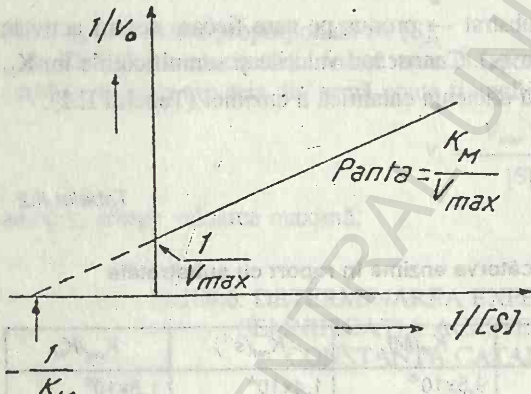


Fig. II.15. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Lineweaver-Burk.

II.8.8. INHIBIŢIA ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

Activitatea multor enzime este inhibată de compuşi chimici diverşi; în sistemele vii asemenea compuşi pot fi de origine endogenă (de exemplu diferiţi metaboliţi) sau de origine exogenă (cum sunt agenţii toxici sau unele medicamente).

Inhibiţia enzimelor poate fi reversibilă şi ireversibilă, aceasta din urmă numindu-se şi inactivare. În ambele cazuri inhibitorul se leagă de enzimă, dar în timp ce în inhibiţia ireversibilă legătura enzimă-inhibitor este puternică (covalentă), în inhibiţia reversibilă legătura este slabă.

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un exemplu de inhibiţie ireversibilă este oferit de acţiunea iodacetamidei asupra enzimelor care au în centrul activ o grupare - SH; are loc reacţia:

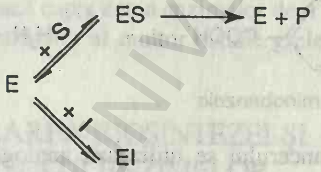
$$Enz-CH_2-SH+I-CH_2-CONH_2 \longrightarrow Enz-CH_2-S-CH_2-CONH_2+HI$$

Complexul $Enz-CH_2-S-CH_2-CONH_2$ este complet inactiv (nu poate fixa substratul).

Tot grupările SH din centrele active pot fi blocate şi cu acidul paraclormercuribenzoic în timp ce grupările hidroxil din centrele active (cum este cazul tripsinei) sunt blocate de inhibitorul di-izopropilfluorofosfat.

Se cunosc două variante majore de inhibiţie reversibilă:

a) Inhibiţia competitivă, produsă de inhibitori care se leagă tot la nivelul centrului activ al enzimei, dar prin legături slabe. În cazul prezenţei simultane în mediu (sau în celule) a substratului şi inhibitorului, între aceştia are loc o competiţie pentru fixarea pe enzimă. La o capacitate egală de legare la nivelul centrului activ a substratului şi inhibitorului, enzima va fixa aceşti competitori în raport cu concentraţiile lor. Inhibitorii competitivi sunt compuşi cu structură apropiată de cea a substratului. Evenimentele care au loc pot fi reprezentate simplificat:



În acest tip de inhibiţie, partea din enzima aflată sub forma complexului EI poate fi recuperată dacă în mediu apare un exces de substrat (datorită reversibilităţii E + I ⇄ EI).

Precizarea că un anumit compus este inhibitor competitiv pentru o enzimă dată se face în mod simplu; se trasează dreapta $1/v_o$ în funcţie de $1/[S]$ pentru prezenţa în mediu a lui E şi S şi apoi aceeaşi dreaptă pentru prezenţa în mediu a E, S şi I. În ultimul caz se remarcă o pantă crescută a dreptei, intersecţia cu ordonata nefiind modificată. Valorile intersecţiei prelungirii dreptei cu abscisa şi panta dreptei sunt modificate cu coeficientul $1 + [I]/K_I$, unde K_I are semnificaţie asemănătoare lui K_M dar pentru reacţia lui E cu I (Fig. II.16).

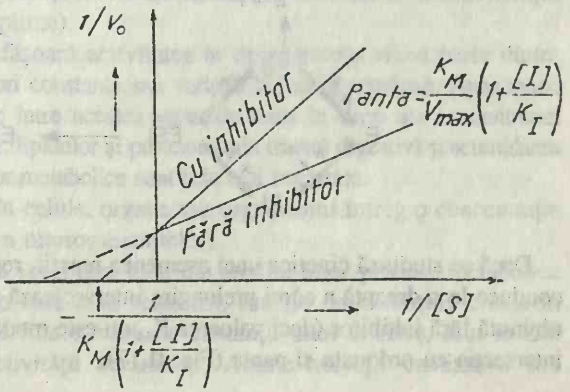
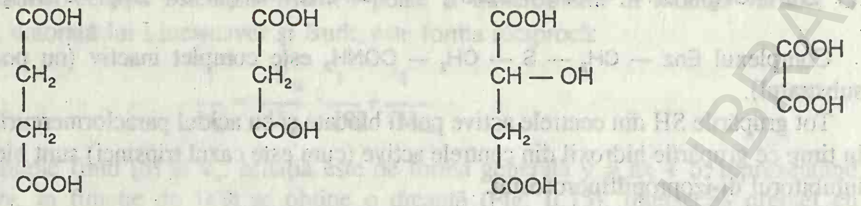


Fig. II.16. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Lineweaver-Burk în cazul inhibiţiei competitive.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Printre numeroasele inhibiţii competitive cunoscute sunt şi următoarele:

Succinat dehidrogenaza, enzima ce catalizează transformarea acidului succinic în acid fumaric, este inhibată de acizii dicarboxilici malonic, malic şi chiar oxalic.



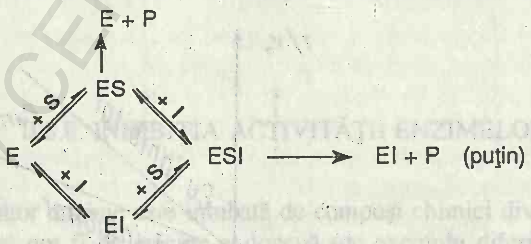
acid succinic   acid malonic   acid malic   acid oxalic

Un număr de medicamente larg utilizate îşi datorează efectele faptului că sunt inhibitori competitivi. De exemplu, sulfanilamida, cea mai simplă sulfamidă, este asemănătoare structural cu acidul paraaminobenzoic pe care îl poate înlocui în cursul sintezei acidului folic de către bacterii (vezi vitamine şi coenzime); cum acidul folic este indispensabil bacteriilor, acestea mor (la om nu se întâmplă acest lucru deoarece el ia din hrană acidul folic).

Aacid para-aminobenzoic   Sulfanilamida

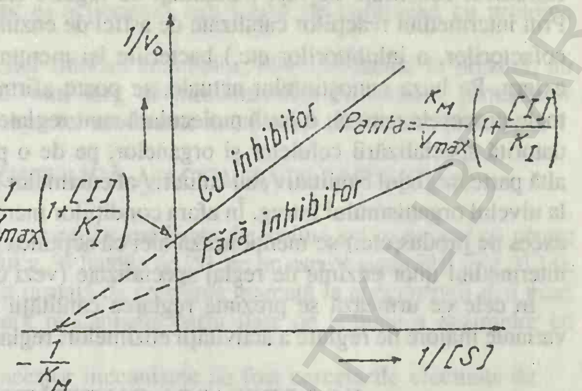
În chimioterapia cancerului se utilizează analogi structurali ai bazelor purinice şi pirimidinice; ei inhibă sinteza de acizi nucleici împiedicând diviziunea celulară care este mult mai rapidă la tumori.

b) Inhibiţia necompetitivă; în acest caz inhibitorul, a cărui structură poate să difere destul de mult de structura substratului, se leagă prin legături slabe în alt loc decât centrul activ al enzimei. Afinitatea pentru substrat a enzimei pare a nu fi modificată. Există însă posibilitatea ca o parte din ES cât şi EI să formeze complex ESI; transformarea lui S din acest complex în P este scăzută în raport cu transformarea lui S din ES, deci atât v_o cât şi V_{max} sunt mai mici. Inhibiţia necompetitivă depinde numai de concentraţia inhibitorului (şi de afinitatea enzimei pentru el) deoarece substratul în exces nu îl poate deplasa pe acesta.



Dacă se studiază cinetica unei asemenea reacţii, reprezentarea $1/v_o$ în funcţie de $1/[S]$ conduce le o dreaptă a cărei prelungire intersectează abscisa în acelaşi punct cu dreapta obţinută fără inhibitor (deci valoarea K_M nu este modificată); în schimb, sunt modificate intersecţia cu ordonata şi panta (Fig. II.17).

Fig. II.17. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Lineweaver-Burk în cazul inhibiţiei necompetitive.



Exemple sunt unele enzime care conţin grupări SH libere în alte poziţii decât centrul activ. Aceste grupări pot fixa prin legături slabe ioni ai unor metale grele cum sunt Ag^+ şi Hg^+ care diminuă sau chiar anulează capacitatea enzimelor de a transforma substratele în produşi. Aşa se explică efectul otrăvitor al multor metale grele.

II.9 REGLAREA BIOSINTEZEI ŞI ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

II.9.1. ASPECTE GENERALE

Însuşiri cum sunt capacitatea catalitică deosebită, specificitatea, inhibarea prin diverşi compuşi etc., se studiază în detaliu urmărind comportarea enzimelor extrase, purificate şi dizolvate în mediu apos; în aceste condiţii, atunci când se studiază acţiunea unui anumit factor, de exemplu a unui inhibitor, ceilalţi parametrii cum sunt temperatura, pH-ul, concentraţia enzimei şi substratului, prezenţa în limitele necesare a cofactorilor etc., se menţin la valorile dorite (de regulă cele optime).

Şi pentru enzimele care îşi desfăşoară activitatea în organismele vii, o parte dintre factorii menţionaţi se menţin la valori constante sau variază în limite restrânse. Apar totuşi relativ frecvent şi situaţii deosebite; între acestea variaţiile mari în timp ale concentraţiei substratului (de exemplu a glucidelor, lipidelor şi proteinelor în tractul digestiv) şi acumularea peste limite a produşilor finali a căilor metabolice sunt cele mai frecvente.

Se menţine în astfel de situaţii în celule, organe sau organismul întreg o concentraţie staţionară şi o activitate constantă a tuturor enzimelor?

Răspunsul la această întrebare a venit mai întâi din studiul unor procese metabolice la organismele simple (bacterii) la care s-au remarcat, funcţie de condiţiile create în mediu, creşteri şi scăderi în limite foarte mari ale cantităţii unor enzime, sau, în alte cazuri, variaţii însemnate ale activităţii enzimelor. Aceste variaţii cantitative sau

calitative, constituie de fapt modalităţi de reglare care sunt atributul biocatalizatorilor. Prin intermediul reacţiilor catalizate de astfel de enzime (dar şi prin prezenţa sau absenţa cofactorilor, a inhibitorilor etc.) bacteriile îşi menţin homeostazia în raport cu mediul extern. Pe baza cunoştinţelor actuale, se poate afirma că şi în organismele superioare toate procesele care au o bază moleculară sunt reglate prin enzime; la aceste organisme, datorită specializării celulelor şi organelor, pe de o parte, şi a funcţiei integrate, pe de altă parte, reglajul cantitativ sau calitativ al enzimelor la un anumit nivel poate avea ecou la nivelul organismului întreg. În afara condiţiilor menţionate (exces sau lipsă de substrat, exces de produs, etc.) se menţionează aici că acţiunea hormonilor se realizează final prin intermediul unor enzime de reglaj specializate (vezi capitolul „Hormoni").

În cele ce urmează se prezintă reglarea cantităţii enzimelor (pe scurt) şi cele două variante majore de reglare a activităţii enzimelor: reglarea alosterică şi reglarea covalentă.

II.9.2 REGLAREA CANTITĂŢII ENZIMELOR

Cantitatea oricărei proteine din organism, deci şi a enzimelor, rezultă din dinamica proceselor de biosinteză şi degradare. Viteza de schimb (turnoverul proteinelor) exprimată prin timpul de înjumătăţire, $T_{1/2}$, este foarte variată (vezi „Metabolismul proteinelor şi al aminoacizilor"). Se ştie că proteinele se sintetizează din aminoacizi; pe de altă parte, produşii de degradare ai proteinelor sunt, de asemenea, aminoacizii. Se poate scrie relaţia:

$$\text{Aminoacizi} \underset{K_d}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} \text{Proteine (enzime)}$$

unde K_s este o constantă generală a procesului de sinteză, iar K_d este o constantă generală a procesului de degradare.

Dependent de valorile celor două constante generale se disting situaţiile:

$K_s > K_d$ concentraţie crescută a enzimei;

$K_s = K_d$ concentraţie staţionară a enzimei;

$K_s < K_d$ concentraţie scăzută a enzimei;

Majoritatea enzimelor au $K_s = K_d$; ele se numesc enzime constitutive. Enzimele la care $K_s > K_d$ se numesc inductibile, cele la care $K_s < K_d$ se numesc represibile. Se face precizarea că inducţia sau represia sintezei enzimelor nu au caracter permanent şi că la o aceeaşi enzimă inducţia sintezei alternează cu represia acesteia în funcţie de necesităţile de moment.

Inducţia sintezei se restrânge de regulă la o singură enzimă dintr-o cale metabolică (de ex. inducţia prin substrat a δ-aminolevulinatsintetazei, δ-ALAS, în calea biosintezei hemului).

Există situaţii de inducţie simultană a mai multor enzime; de exemplu, inducţia enzimelor hepatice ilustrată prin aceea că la o dietă bogată în proteine, în decurs de 1-2 zile sunt sintetizate cantităţi mari de enzime din căile metabolice de degradare ale aminoacizilor şi din gluconeogeneză. Schimbând dieta în una bogată în glucide, sinteza enzimelor menţionate este represată şi este indusă sinteza enzimelor din calea glicolitică etc.

Represia sintezei enzimelor se face de regulă prin intermediul unor compuşi cu moleculă mică, numiţi corepresori; ei acţionează sub forma de complexe cu proteine specializate numite aporepresori.

Mecanismele inducţiei şi represiei sintezei enzimelor, bine cunoscute în prezent, nu pot fi înţelese decât în contextul mai larg al mecanismului biosintezei proteinelor coordonat de acizii nucleici. Aceste aspecte sunt tratate în capitolul „Biosinteza proteinelor".

II.9.3. REGLAREA ALOSTERICĂ A ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

În subcapitolul referitor la cinetica reacţiilor catalizate de enzime s-a menţionat că pentru unele dintre acestea curba variaţiei lui v_o în funcţie de [S] are un aspect sigmoidal (Fig. II.18).

Viteza mică a reacţiei la început urmată de creşterea marcată la concentraţii mai mari ale substratului, sunt rezultatul unor mecanisme particulare de acţiune a enzimelor ce catalizează aceste reacţii.

Hotărâtoare pentru elucidarea acestor mecanisme au fost cercetările efectuate de J. Monod, J.P. Changeux şi F. Jacob, în anii '60, asupra reglării activităţii unor enzime bacteriene. S-a constatat de exemplu că în biosinteza L-izoleucinei din L-treonină (care constă din cinci reacţii catalizate de tot atâtea enzime), L-izoleucina în exces inhibă întreaga cale metabolică. Nu sunt însă inhibate toate enzimele ci doar prima dintre ele, L-treonin-dehidrataza; ea catalizează transformarea L-treoninei în α-cetobutirat + amoniac (Fig. II.19).

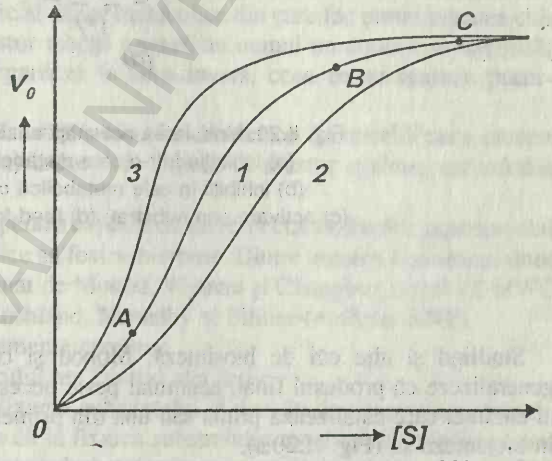


Fig. II.18. Reprezentarea grafică a $v_o = f([S])$ pentru:
1. enzimă alosterică cu efect homotrop;
2. enzimă alosterică + modulator pozitiv;
3. enzimă alosterică + modulator negativ.

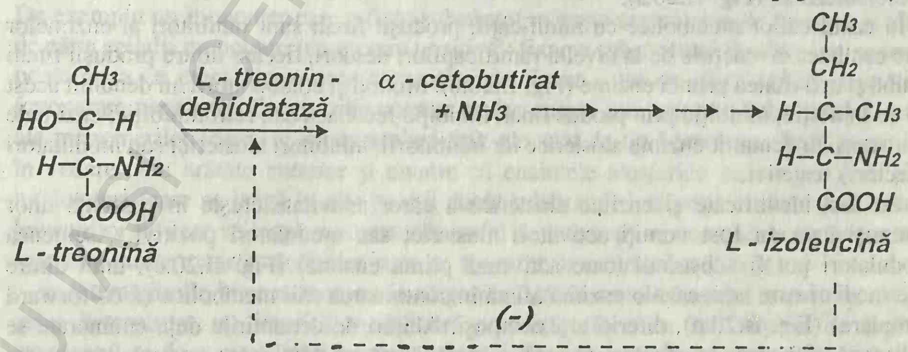


Fig. II.19. Inhibarea activităţii L-treonin-dehidratazei de către L-izoleucina aflată în exces.

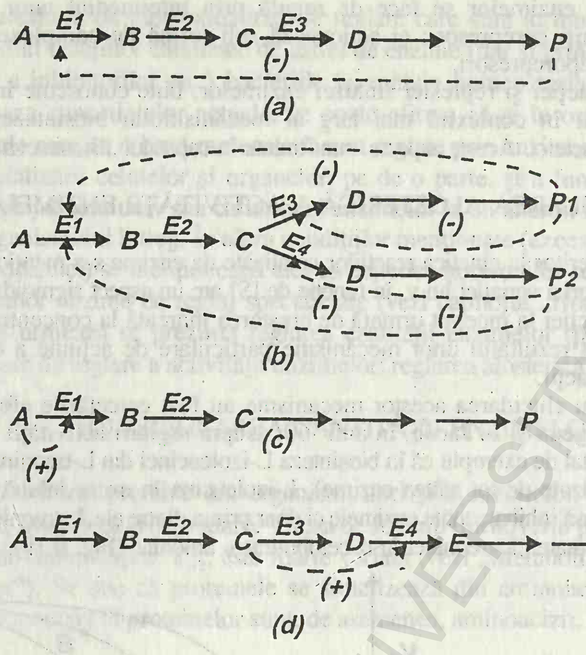


Fig. II.20. Modularea activităţii enzimelor alosterice:
(a) inhibiţie într-o cale metabolică lineară;
(b) inhibiţii în cale metabolică cu ramificaţii;
(c) activare prin substrat; (d) feed-forward stimulare.

Studiind şi alte căi de biosinteză, Monod şi colaboratorii au fost în măsură să generalizeze că produsul final, acumulat peste necesităţile de moment, devine inhibitor al enzimei care catalizează prima sau una din primele reacţii ale şirului celor implicate în biosinteza sa (Fig. II.20.a).

În cazul căilor metabolice cu ramificaţii, produşii finali sunt inhibitori ai enzimelor care catalizează reacţiile de la nivelul ramificaţiilor; deseori, fiecare dintre produşii finali inhibă şi activitatea primei enzime (Fig. II.20.b). Monod şi colaboratorii au denumit acest tip de inhibiţie, inhibiţie prin produs final, inhibiţie feedback sau retroinhibiţie; enzimele inhibate s-au denumit enzime alosterice iar inhibitorii, inhibitori alosterici sau modulatori (efectori) negativi.

Au fost identificate şi enzime alosterice a căror activitate creşte în prezenţa unor compuşi care au fost numiţi activatori alosterici sau modulatori pozitivi. Asemenea modulatori pot fi substratul (care activează prima enzimă) (Fig. II.20.c), unul dintre intermediari care activează o enzimă aflată în continuarea căii metabolice (feed-forward stimulare) (Fig. II.20.d), diferiţi alţi compuşi. Alături de denumirile deja enumerate se utilizează şi aceea de efectori alosterici în legătură cu totalitatea compuşilor cu rol activator sau inhibitor.

Pentru cele mai multe enzime alosterice există atât modulatori pozitivi cât şi negativi.

Modulatorii intensifică sau scad activitatea enzimelor ca urmare a fixării lor pe acestea. Locurile de fixare sunt distincte pentru modulatorii pozitivi şi cei negativi şi altele decât centrul activ. De aici denumirile de enzime alosterice, inhibitori alosterici (allo = alt loc).

Există în prezent mai multe argumente, bazate pe cercetări experimentale, privind locurile distincte de fixare pe enzime a activatorilor şi inhibitorilor de acest tip. Astfel, s-au realizat „desensibilizări" ale unor enzime alosterice prin acţiuni fizice sau chimice: pH-uri extreme, enzime proteolitice, ureea, temperaturi scăzute sau crescute, unele radiaţii; s-au realizat astfel de modele experimentale încât să fie afectate numai locurile de legare ale modulatorilor nu şi centrul activ. În alte experienţe s-a putut proteja centrul activ de acţiunea unor agenţi denaturaţi prin intermediul modulatorilor.

Şi alte însuşiri ale enzimelor alosterice, a reacţiilor catalizate de ele, precum şi a condiţiilor în care se desfăşoară aceste reacţii au importanţă pentru cunoaşterea fie a mecanismului de acţiune, fie a rolului de reglatori a căilor metabolice. Între acestea se citează:

- din punct de vedere structural, aproape toate enzimele alosterice sunt oligomeri, de regulă cu număr par de monomeri: doi (mai rar), patru, şase etc.;
- reacţiile catalizate de aceste enzime au $\Delta G^{0\prime}$ negativ, sunt deci exergonice şi ireversibile; ele imprimă sensul unic al căilor metabolice din care fac parte; situarea chiar la începutul căii metabolice a acestor reacţii asigură nu numai un control al intensităţii căii, dar şi imposibilitatea parcurgerii ei în sens invers, ceea ce se traduce printr-o economicitate maximă;
- compuşii chimici cu rol reglator a enzimelor alosterice (efectorii) sunt prezenţi permanent (rareori doar intermitent) la locul de acţiune al acestor enzime; variază doar concentraţia lor.

Mecanismele (modele) propuse pentru explicarea, cu respectarea datelor experimentale arătate, a acţiunii enzimelor alosterice au fost numeroase. Dintre acestea s-au impus două: modelul concertat (simetric) imaginat de Monod, Wyman şi Changeux (modelul MWC) şi modelul secvenţial propus de Koshland, Nemethy şi Filmer (modelul KNF).

Cele două modele au câteva elemente comune:

a. fiecare monomer al oligomerului are centrul său activ;

b. monomerii „cooperează" în fixarea substratului şi deci în desfăşurarea procesului catalitic. Prin cooperare se înţelege că la fixarea substratului monomerii se influenţează. De exemplu un monomer care a fixat substratul măreşte capacitatea de fixare a acestuia de către ceilalţi monomeri (cooperare pozitivă); fixarea substratului de către un monomer poate avea ca efect diminuarea capacităţii de fixare a lui de către ceilalţi monomeri (cooperare negativă). Cooperările acestea se fac numai prin intermediul centrelor active ale monomerilor (deci centre de acelaşi tip); ele sunt de tip homotrop. Dacă avem însă în vedere cele arătate anterior şi anume că enzimele alosterice sunt controlate şi de modulatori (care se leagă în alte poziţii decât substratul) interacţia se face şi la nivelul locusurilor pe care se leagă modulatorii; astfel de interacţii se numesc de tip heterotrop; cele mai multe enzime alosterice sunt de tip mixt, homotrop-heterorop;

c. interacţiunile între monomeri în oligomer, atât în cazul efectului homotrop cât şi a celui heterotrop, nu implică modificări profunde (formare sau rupere de legături covalente) ci doar modificări conformaţionale. De aceea reglarea alosterică se face cu consum minim de energie.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

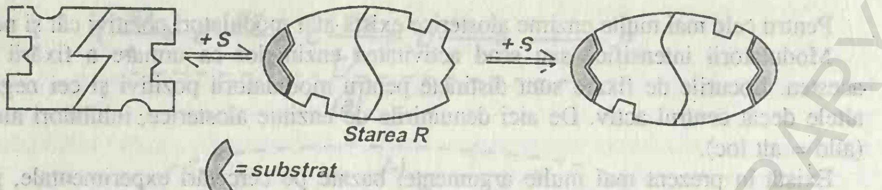


Fig. II.21. Fixarea substratului şi tranziţia T → R
în cazul unei enzime alosterice formată din doi monomeri.

Modelul simetric postulează suplimentar:

- Oligomerul trebuie să îndeplinească permanent condiţia de simetrie, respectiv centrele active ale monomerilor să fie echivalente în interacţia cu ceilalţi monomeri; de fapt, oligomerul poate exista numai în două stări: conformaţia T (tensionată, constrânsă) în care enzima are afinitate mică faţă de substrat şi conformaţia R (relaxată) cu afinitate mare pentru substrat. Starea T are centrul activ preformat, starea R îl are definitivat. Cele două stări se află în echilibru, constanta de echilibru fiind L (constantă alosterică). Termenii T şi R se referă la flexibilitatea oligomerului, respectiv felul şi numărul interacţiunilor între monomeri. În lipsa substratului starea predominantă este starea T.

Dacă se consideră numai interacţiunea de tip homotrop, fixarea substratului la starea T se face cu atât mai greu cu cât concentraţia lui este mai mică (Fig. II.18, porţiunea O-A pe curba 1). Într-o enzimă alosterică formată numai din doi monomeri fixarea substratului la unul dintre aceştia determină tranziţia T → R; în virtutea postulatului simetriei, dar şi al principiului cooperării, al doilea monomer dobândeşte automat conformaţia R şi el va fixa mult mai uşor substratul (Fig. II.21, porţiunea A-B, pe curba din Fig. II.18), porţiunea B-C pe aceeaşi curbă, corespunde saturării enzimei cu substrat.

La o enzimă alosterică formată din patru sau mai mulţi monomeri efectul cooperativ este mult mai pronunţat deoarece fixarea substratului la un singur monomer determină tranziţia T → R la întreg oligomerul.

La enzimele homotrop-heterotrope, efectul madulatorilor se suprapune peste cel al substratului. Cei pozitivi (activatorii) stabilizează conformaţia R, deci favorizează deplasarea echilibrului T ⇄ R spre dreapta; cei negativi (inhibitorii) stabilizează conformaţia T (Fig. II.22; curbele 2 şi 3 pe Fig. II.18).

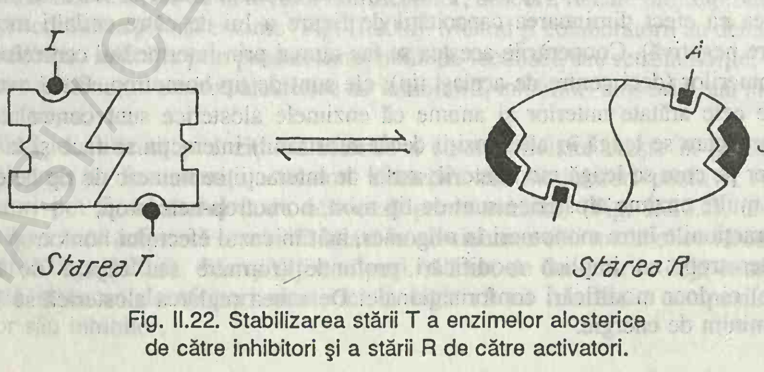


Fig. II.22. Stabilizarea stării T a enzimelor alosterice
de către inhibitori şi a stării R de către activatori.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diferența esențială între modelul secvențial și modelul simetric constă în aceea că primul abandonează principiul simteriei. Legarea substratului de către un monomer reclamă și în acest caz tranziția T → R dar nu este exclusă interacția stării R a acestuia cu stările T ale celorlalți monomeri. Cooperativitatea se restrânge de astă dată la influența monomerilor T și R vecini. Legarea substratului de către primul monomer se face și în acest caz cu dificultate datorită stării T a tuturor monomerilor enzimei. Modificându-și conformația prin legarea substratului, acest monomer va induce modificarea corespunzătoare doar la monomerul vecin care va fixa substratul cu mai multă ușurință. Chiar dacă numărul enzimelor cu cooperativitate negativă este foarte mic (dintre acestea se citează tirozil-ARN$_t$-sintetaza), modelul secvențial s-a dovedit a fi mult mai potrivit decât cel simetric în cazul acestora.

Ulterior elaborării celor două modele, Eigen a demonstrat că ele sunt cazuri particulare ale unei scheme mult mai complexe; dependent de particularitățile structurilor terțiară și cuaternară, unele enzime alosterice acționează după modelul simetric, altele după cel secvențial, altele după modelul generalizat (cel propus de Eigen).

Sub aspect cinetic, Hill a stabilit o ecuație cu valabilitate atât pentru enzimele Michaeliene cât și pentru cele alosterice:

$$\log \frac{v_o}{V_{max} - v_o} = n_H \cdot \log[S] - \log K$$

unde v_o, V_{max} și S au semnificațiile cunoscute, K este constantă specifică pentru interacțiunea enzimă-ligand; n_H este coeficientul Hill, o constantă empirică care reflectă atât numărul locusurilor de fixare a liganzilor cât și intensitatea interacțiunii acestora.

Reprezentând grafic log $v_o/V_{max} - v_o$ în funcție de log [S] (Fig. II.23) se obține dreapta 1 (pornind din origine) pentru enzime lipsite de cooperativitate, dreapta 2 (intersecție abscisa) pentru cele cu cooperativitate pozitivă și 3 (intersecție ordonată) pentru cele cu cooperativitate negativă. Panta dreptelor 2 și 3 redă gradul de cooperativitate.

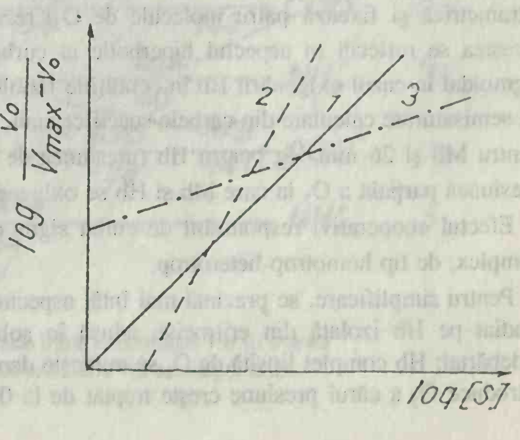


Fig. II.23. Dreptele obținute la reprezentarea grafică a ecuației Hill pentru enzime lipsite de cooperativitate (1), cu cooperativitate pozitivă (2) și cooperativitate negativă (2).

În ultimii 15-20 ani s-au evidenţiat la unele enzime alosterice structuri şi mecanisme de acţiune mult mai complexe. Un exemplu este aspartat-transcarbamilaza, enzimă cu rol de reglare în calea de biosinteză a nucleotidelor pirimidinice (vezi şi capitolul „Metabolismul nucleotidelor purinice şi pirimidinice"). Enzima are 12 subunităţi dintre care şase sunt „catalitice" şi şase sunt „reglatorii". În starea T, subunităţile catalitice sunt grupate în doi trimeri iar subunităţile reglatorii sunt grupate în trei dimeri, întreg ansamblul având o anumită simetrie şi o maximă compactizare. Tranziţia T → R constă în trecerea spre un aranjament cu o altă simetrie, în care ansamblul subunităţilor este mult mai deschis. Cele două substrate se leagă numai la unităţile catalitice: legarea şi transformarea se realizează printr-un mecanism cooperativ sofisticat şi deosebit de eficient. Produsul final al căii metabolice, acidul citidintrifosforic (CTP) se leagă numai la subunităţile reglatorii producând o inhibiţie feed-back.

II.9.4. REGLAREA ALOSTERICĂ A FUNCŢIEI HEMOGLOBINEI

Reglarea alosterică nu se restrânge numai la enzime. Funcţia hemoglobinei este reglată tot printr-un asemenea mecanism.

Hemoblobina (Hb) şi mioglobina (Mb) sunt hemoproteine care în organism îndeplinesc funcţii vitale: prima transportă O_2 de la plămâni la celelalte ţesuturi şi CO_2 în sens invers, cea de a doua depozitează şi dispersează oxigenul în muşchi. Structurile componentelor proteice ale Mb şi Hb sunt prezentate în alte capitole ("Proteine", „Metabolismul hemoproteinelor"). Cunoaşterea acestora este necesară pentru înţelegerea reglării alosterice a funcţiei Hb.

Din punct de vedere funcţional, comun pentru Mb şi Hb este fixarea O_2 la nivelul hemului: mai precis, O_2 se dispune între Fe^{2+} (legându-se coordinativ la acesta) şi histidina distală (cu aceasta interacţionează electrostatic). Din faptul însă că Mb nu are structură cuaternară şi deci fixează o singură moleculă de O_2, în timp ce Hb are structură tetrametrică şi fixează patru molecule de O_2, rezultă diferenţe importante între ele. Acestea se reflectă în aspectul hiperbolic al curbei de oxigenare a Mb faţă de cel sigmoidal în cazul oxigenării Hb în condiţiile fiziologice (Fig. II.24). Valorile presiunii de semisaturare calculate din curbele specifice sunt, de asemenea, net diferite: 1 mm Hg pentru Mb şi 26 mm Hg pentru Hb (presiunea de semisaturare, notată P_{50}, reprezintă presiunea parţială a O_2 la care Mb şi Hb se oxigenează în proporţie de 50%).

Efectul cooperativ, responsabil de curba sigmoidală a Hb (şi de P_{50} ridicată) este complex, de tip homotrop-heterotrop.

Pentru simplificare, se prezintă mai întâi aspectul homotrop al efectului. El poate fi studiat pe Hb izolată din eritrocite, adusă în soluţie apoasă din care O_2 este apoi îndepărtat; Hb complet lipsită de O_2 se numeşte deoxigenata. Dacă în această soluţie se introduce O_2 a cărui presiune creşte treptat de la 0 la 100 mm Hg şi se determină pe

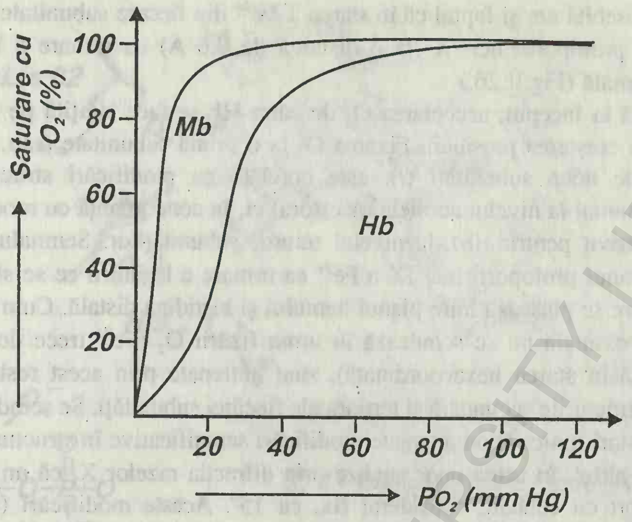


Fig. II.24. Curbele de oxigenare ale mioglobinei (Mb) şi hemoglobinei (Hb).

parcurs câtă Hb a fixat O_2, se obţine o curbă sigmoidală apropiată de cea din Fig II.19. (diferenţa faţă de aceasta ţine de influenţa în condiţiile fiziologice a factorilor care determină caracterul homotrop-heterotrop al efectului). Interpretarea, bazată şi pe alte măsurători experimentale directe, este că Hb deoxigenată este în starea T, cu afinitate foarte redusă pentru O_2. Structural, această stare se caracterizează printr-un număr maxim de interacţiuni atât intracatenare cât şi intercatenare; interesează mai ales un număr de opt legături ionice stabilite între grupări carboxil şi amino (Fig. II.25).

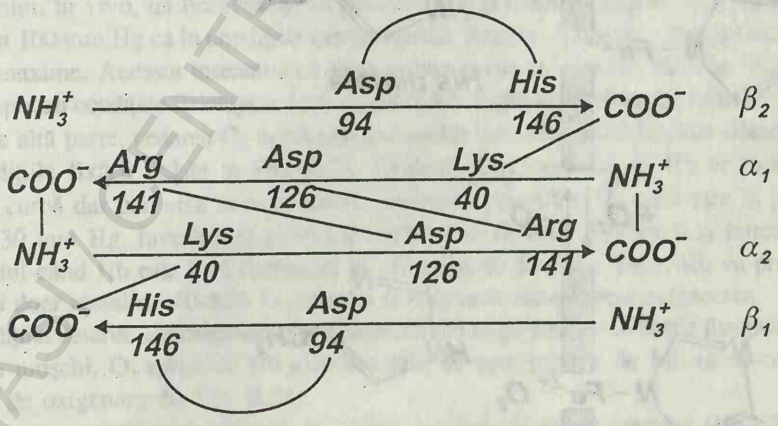


Fig. II.25. Legături ionice între subunităţile Hb în starea T; acestea se scindează când Hb se oxigenează.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Importanţă deosebită are şi faptul că în starea T Fe^{2+} din fiecare subunitate este situat în afara planului protoporfirinei IX (la o distanţă de 0,6 A) ca urmare a legării lui de histidina proximală (Fig.II.26.)

Neînsemnată la început, acceptarea O_2 de către Hb se face simţită pe măsură ce se „forţează" prin creşterea presiunii. Fixarea O_2 la o primă subunitate (sau, după Perutz, deodată la cele două subunităţi α), este corelată cu modificări structurale relativ însemnate nu numai la nivelul acesteia (acestora) ci, în concordanţă cu modelul simetric (considerat potrivit pentru Hb), la nivelul tuturor subunităţilor. Semnalul este dat de revenirea în planul protoporfirinei IX a Fe^{2+} ca urmare a legăturii ce se stabileşte între acesta şi O_2 care se plasează între planul hemului şi histidina distală. Cum legătura Fe^{2+} cu histidina proximală nu se scindează în urma fixării O_2 (Fe^{2+} trece doar din starea pentacoordinată în starea hexacoordinată), sunt antrenate prin acest rest aminoacidic modificări în structurile secundară şi terţiară ale fiecărei subunităţi. Se scindează totodată şi cele opt legături ionice fiind angajate modificări semnificative în structura cuaternară. S-a stabilit de altfel, în urma unor analize prin difracţia razelor X, că un dimer αβ se roteşte în raport cu celălalt, considerat fix, cu 15°. Aceste modificări (influenţate şi factorii de care se face deocamdată abstracţie) constituie de fapt tranziţia T → R a Hb. Afinitatea mare pentru O_2 a stării R se traduce printr-o rapidă fixare a acestuia de către subunităţile 2, 3 şi 4 (sau 3 şi 4). Doar în apropierea presiunii de 100 mm Hg, capacitatea de fixare diminuă ca urmare a saturării.

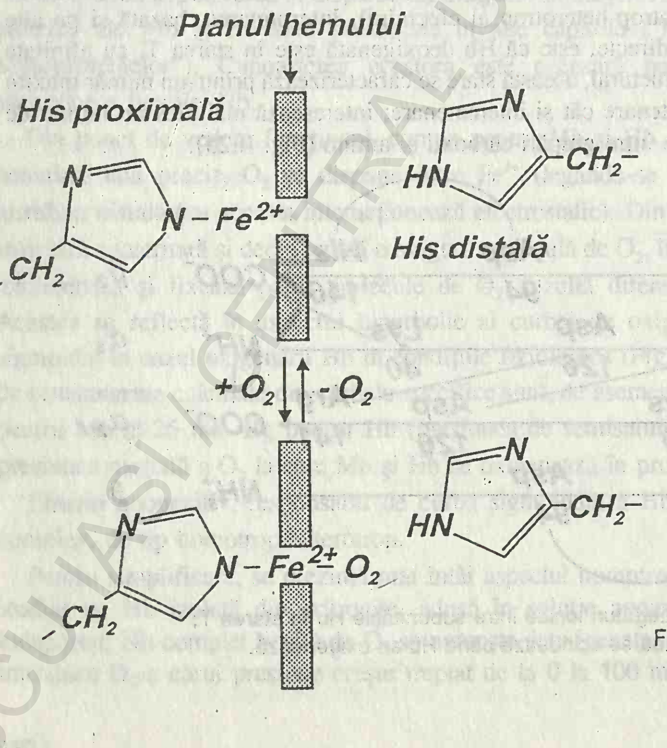


Fig. II.26. Poziţia Fe^{2+} faţă de planul hemului în Hb neoxigenată şi oxigenată.

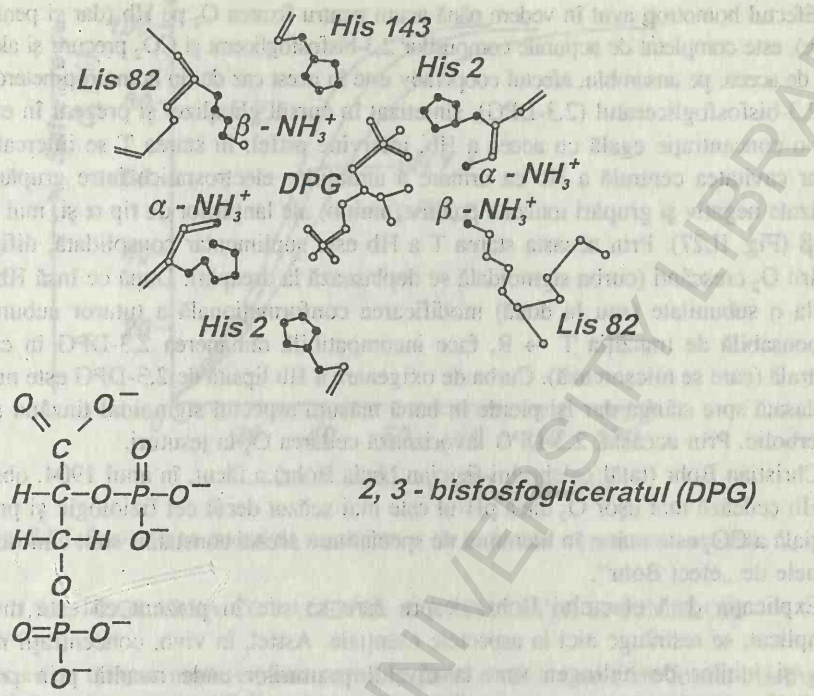


Fig. II.27. Structura 2,3-DPG şi intercalarea acestuia în cavitatea centrală a Hb neoxigenate.

O variaţie atât de mare a presiunii parţiale a O_2 pentru ca acesta să se fixeze pe Hb ar constitui, în vivo, un dezavantaj. În plămâni însă presiunea parţială a O_2 nu variază între 0 şi 100 mm Hg ca în condiţiile experimentale descrise ci ea este constant la nivelul valorii maxime. Aceasta înseamnă că doar ultima porţiune a curbei din Fig. II.24 este valabilă pentru condiţiile fiziologice, ceea ce şi explică oxigenarea extrem de uşoară a Hb.

Pe de altă parte, cedarea O_2 la nivelul ţesuturilor este favorizată şi chiar determinată de condiţiile fixării redate în Fig. II.24. Evident, disocierea O_2 de Hb se face după aceeaşi curbă dar parcursă în sens invers; presiunea parţială a O_2, care este în ţesuturi de cca 30 mm Hg, favorizează procesul cedării sale de către Hb dar îl şi întrerupe în momentul când Hb este încă oxigenată în proporţie de 50-60%. Deci, Hb va prelua în plămâni doar restul de 40-50% O_2 ceea ce favorizează suplimentar oxigenarea.

Condiţiile descrise ale oxigenării şi deoxigenării Hb asigură şi alte avantaje funcţionale:

a) în muşchi, O_2 cedat de Hb este deosebit de uşor preluat de Mb (a se compara curbele de oxigenare din Fig. II.24);

b) tot cu uşurinţă este cedat O_2 în timpul sarcinii, de la Hb mamei (HbA_2) la Hb embrionului ($HbE = \alpha_2\varepsilon_2$) şi Hb fătului ($HbF = \alpha_2\gamma_2$) ale căror curbe de oxigenare sunt, de asemenea, sigmoidale, dar deplasate la stânga în raport cu cea a HbA_2.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Efectul homotrop avut în vedere până acum pentru fixarea O_2 pe Hb (dar şi pentru disociere), este completat de acţiunile compuşilor 2,3-bisfosfoglicerat şi CO_2 precum şi ale ionilor H^+; de aceea, pe ansamblu, efectul cooperativ este în acest caz de tip homotrop-heterotrop.

2,3-bisfosfogliceratul (2,3-DPG), sintetizat în cursul glicolizei şi prezent în eritrocite într-o concentraţie egală cu aceea a Hb, intervine astfel: în starea T se intercalează în chiar cavitatea centrală a Hb ca urmare a atracţiilor electrostatice între grupările sale ionizate negativ şi grupări ionizate pozitiv (amino) ale lanţurilor de tip α şi, mai ales, de tip β (Fig. II.27). Prin aceasta starea T a Hb este suplimentar consolidată, dificultatea fixării O_2 crescând (curba sigmoidală se deplasează la dreapta). După ce însă Hb a fixat O_2 la o subunitate (sau la două) modificarea conformaţională a tuturor subunităţilor, responsabilă de tranziţia T → R, face incompatibilă rămânerea 2,3-DPG în cavitatea centrală (care se micşorează). Curba de oxigenare a Hb lipsită de 2,3-DPG este nu numai deplasată spre stânga dar îşi pierde în bună măsură aspectul sigmoidal tinzând spre cel hiperbolic. Prin aceasta, 2,3-DPG favorizează cedarea O_2 la ţesuturi.

Christian Bohr (tatăl celebrului fizician Niels Bohr) a făcut, în anul 1904, observaţia că Hb cedează mai uşor O_2 dacă pH-ul este mai scăzut decât cel fiziologic şi presiunea parţială a CO_2 este mare; în literatura de specialitate aceste constatări sunt cunoscute sub numele de „efect Bohr".

Explicaţia dată efectului Bohr, despre care se ştie în prezent că este mult mai complicat, se restrânge aici la aspectele esenţiale. Astfel, în vivo, concentraţii mari ale CO_2 şi ionilor de hidrogen sunt la nivelul ţesuturilor unde rezultă prin procesele catabolice; ionii de hidrogen mai rezultă:

a) la formarea între Hb (dar şi alte proteine din plasmă) a carbamaţilor sub forma cărora cca. 15% din CO_2 este transportat la plămâni în vederea eliminării; grupările amino care reacţionează cu CO_2 sunt ale unor aminoacizi N-terminali din lanţurile Hb şi celorlalte proteine:

$$R - NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons \underset{\text{ion carbamat}}{R - NH - COO^-} + H^+$$

b) la transformarea marei majorităţi a CO_2 (cc. 85%) în ionul bicarbonat, compus solubil, care este transportat de asemenea la plămâni:

$$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{anhidraza carbonică}} H_2CO_3$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Valoarea mai mică decât 7,4 a pH-ului (cât este valoarea normală în sânge) şi presiunea parţială mare a CO_2 favorizează cedarea O_2, curba de oxigenare fiind deplasată spre dreapta (Fig. II.28).

În plămâni echilibrele reacţiilor de la punctele a şi b sunt deplasate spre stânga datorită eliminării CO_2 prin respiraţie. Concentraţia ionilor H^+ descreşte, pH-ul depăşeşte uşor valoarea de 7,4; curba de oxigenare se deplasează la stânga fiind favorizată fixarea O_2 pe hemoglobină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

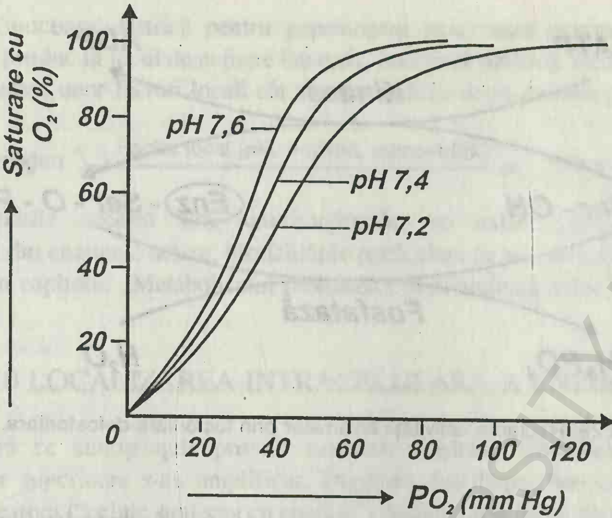


Fig. II.28. Deplasarea curbei de oxigenare a Hb în funcţie de valoarea pH-ului.

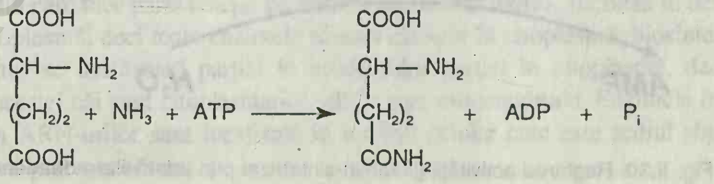
II.9.5. REGLAREA COVALENTĂ A ACTIVITĂŢII ENZIMELOR

În prezent se cunosc multe enzime cu rol reglator a căror conversie formă inactivă - formă activă are loc prin modificări chimice care implică formarea sau ruperea unor legături covalente.

Cazul cel mai frecvent este al enzimelor care se activează prin fosforilare (sau defosforilare). Fosforilarea se face de către ATP care transferă, de regulă, un singur rest de acid fosforic; acesta esterifică grupări hidroxil ale unor resturi de serină, mai rar tirozină sau treonină, care nu fac parte din centrul activ. Reacţiile de fosforilare sunt catalizate de kinaze specifice, care, la rândul lor, pot exista în forme fosforilate numite fosfokinaze şi defosforilate numite defosfokinaze. Fiind puternic exergonice, reacţiile de fosforilare sunt ireversibile. Transformarea inversă, formă defosforilată - formă fosforilată, se face hidrolitic în prezenţa unor fosfataze specifice; şi aceste reacţii sunt ireversibile (Fig. II.29).

Enzimele interconvertibile prin fosforilare-defosforilare apar numai în celulele organismelor superioare. După caz, unele enzime interconvertibile pe această cale sunt active în forma fosforilată (glicogenfosforilaza) sau defosforilată (glicogensintetaza). Activarea unor enzime prin fosforilare (defosforilare) este, de multe ori, etapa ultimă într-o cascadă de evenimente declanşată odată cu fixarea de către celule a unor hormoni sau alţi compuşi chimici cu rol reglator. Aceste mecanisme sunt tratate în capitolul „Hormoni".

O activare-inactivare printr-un mecanism covalent aparte este întâlnită la enzima glutaminsintetază care catalizează reacţia:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

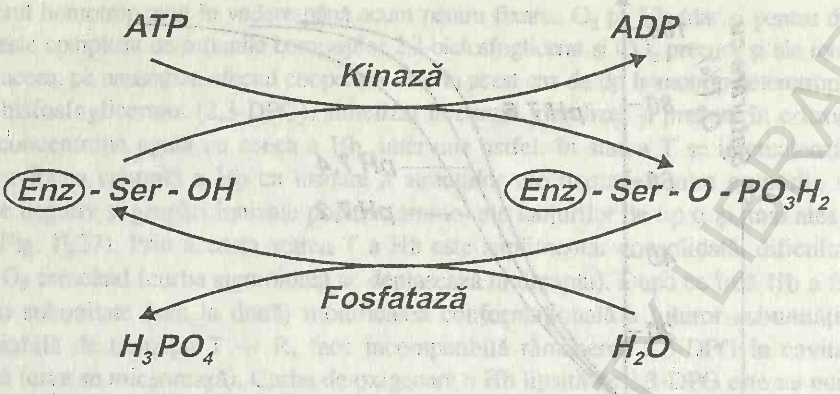


Fig. II.29. Reglarea activităţii enzimelor prin fosforilare-defosforilare.

Forma activă a enzimei este transformată în formă inactivă prin „adenililare" (ataşarea printr-o legătură covalentă a unui rest de AMP). Ca şi fosforilarea, adenililarea se face cu ATP dar la un rest de tirozină; reacţia este ireversibilă. Revenirea la forma activă se face şi în acest caz prin hidroliză (Fig. II.30).

Glutaminsintetaza este o enzimă a cărei activitate este reglată atât alosteric cât şi covalent. Reglarea covalentă este cea arătată. Reglarea alosterică prezintă două aspecte: este multiplă în sensul că există nouă compuşi cu rol de modulatori negativi (între care histidina, triptofanul, carbamilfosfatul) şi câţiva modulatori pozitivi; pe de altă parte, este cumulativă în sensul că modulatorii pot acţiona simultan (în totalitate sau numai unii) şi atunci efectul lor se însumează.

Tot activări de tip covalent sunt şi transformările proenzimelor de tipul pepsinogenului, tripsinogenului, chimotripsinogenului, procarboxidazei etc. în enzimele pepsină, tripsină, chimotripsină, carboxipeptidază. Formele inactive (zimogenii) sunt cele produse la locul

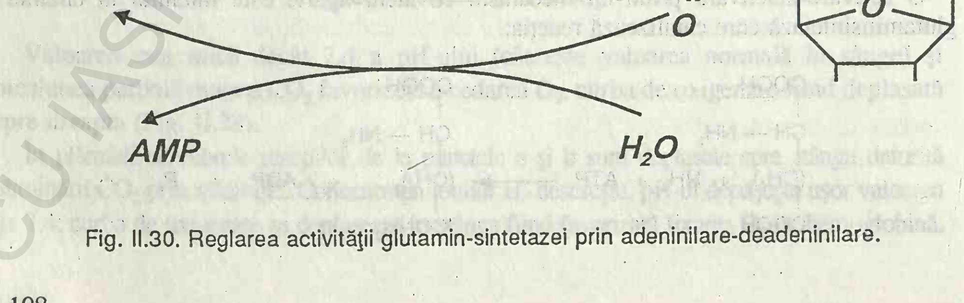


Fig. II.30. Reglarea activităţii glutamin-sintetazei prin adeninilare-deadeninilare.

de sinteză (mucoasa gastrică pentru pepsinogen, pancreasul pentru toate celelalte); activările se produc la locul de acţiune (stomac, intestinul subţire). Aceste activări au loc atât sub acţiunea unor factori locali cât şi autocatalitic, după schema generală:

$$\text{Zimogen} \xrightarrow{\text{Factor local (pH, enzimă, autocatalitic)}} \text{Enzimă activă}$$

Transformările acestea sunt unidirecţionale, nu există posibilitatea refacerii zimogenului din enzimele active. Modalităţile particulare de activare a acestor enzime se pot urmări în capitolul „Metabolismul proteinelor şi al aminoacizilor".

II.10 LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR

Pe măsură ce cunoştinţele privind structura celulelor specializate din ţesuturile organismelor superioare s-au amplificat, imaginea distribuţiei haotice a enzimelor în interiorul acestora ("celule sunt saci cu enzime") datând din secolul trecut, a fost înlocuită cu una diametral opusă.

Separarea prin ultracentrifugare a organitelor celulare urmată de identificarea prin tehnici histochimice şi biochimice a enzimelor în fiecare dintre aceste organite a constituit metodologia care a permis elaborarea unui adevărat tablou al distribuţiei intracelulare a enzimelor. Câteva elemente ale acestui tablou se prezintă în continuare.

Este o regulă generală că orice celulă specializată dispune numai de acele enzime care catalizează efectiv reacţii în celula dată. Unele enzime (sau seturi de enzime) se află în toate tipurile de celule specializate. Este cazul enzimelor implicate în căi metabolice fundamentale cum sunt: biosinteza proteinelor şi acizilor nucleici, glicoliza, ciclul acizilor tricarboxilici etc. Fără funcţionarea acestor căi, care asigură multiplicarea şi dezvoltarea, nici un tip de celule nu poate exista.

Tot ca regulă generală, o aceaşi enzimă apare în forme uşor diferite de la un tip de celule la altul. Diferenţele acestea apar atât la nivelul structurii primare şi conformaţiei (enzime homoloage) cât şi la nivelul structurii cuaternare (izoenzimele); activitatea lor diferenţiată, alături de concentraţia variabilă sunt în raport direct cu necesităţile diferite ale tipurilor de celule.

Pe de altă parte, fiecare tip de celulă specializată dispune de seturi de enzime care catalizează reacţiile din căile metabolice particulare: enzimele implicate în biosinteza hormonilor tiroidieni se află numai în tiroidă, cele care participă la biosinteza ureei se află numai în ficat, creatinkinaza se află aproape în totalitate în muşchi etc.

Un alt aspect priveşte locul în care se află diverse enzime într-o celulă dată; el coincide, evident, cu locul de desfăşurare a căii metabolice sau a unei secvenţe a căii metabolice din care face parte reacţia pe care o catalizează. Astfel, glicoliza se desfăşoară numai în citoplasmă, deci toate enzimele acestei căi sunt în citoplasmă; biosinteza ureei (în hepatocite) se desfăşoară parţial în mitocondrii parţial în citoplasmă, deci unele enzime ale acestei căi sunt citoplasmatice, altele sunt mitocondriale. Enzimele implicate în biosinteza ARN-urilor sunt localizate în nucleul celular care este sediul sintezei, şi enumerarea ar putea continua.

Unele enzime au localizare dublă: aspartat aminotransferaza (ASAT = GOT) cât şi izocitratdehidrogenaza (ICDH) se află atât în citoplasmă cât şi în mitocondri. ICDH citoplasmatică are coenzima $NADP^+$, cea din mitocondri are NAD^+. ICDH mitocondrială catalizează o reacţie a ciclului acizilor tricarboxilici; ICDH citoplasmatică, în relaţie cu cea mitocondrială, asigură transferul echivalenţilor de reducere prin membrana acestui organit (vezi „Metabolismul energetic").

Multe enzime sunt legate de membrana celulară sau sunt chiar incluse în această membrană, cu localizare spre exterior sau spre citoplasmă. În cazul mitocondriilor, enzimele pot fi legate de membrana externă, de membrana internă, multe se află în matrix (Tabelul II.3).

Tabelul II.3

Localizarea unor enzime în mitocondriile celulelor hepatice

Membrană externă	Monoaminooxidaza (MAO) Acil-CoA sintetaza Fosfolipaza A_2 Nucleoziddifosfatkinaza
Spaţiul între membrane	Adenilat Kinaza
Membrana internă	NADH dehidrogenaza Citocromi (b, c, c_1, a, a_3) Succinat dehidrogenaza
Matrix	Citrat sintetaza Izocitratdehidrogenaza (ICDH) Fumaraza Glutamatdehidrogenaza Enzimele de oxidare ale acizilor graşi

II.11. ENZIMELE ŞI PATOLOGIA

În plasmă se află un număr foarte mare de enzime. Dependent de existenţa sau inexistenţa la acest nivel a substratelor corespunzătoare (în alţi termeni după cum enzimele catalizează sau nu reacţii în plasmă), ele se împart în:

a) Enzime plasmatice funcţionale cum sunt: lipoproteinlipaza, pseudocolinesteraza, lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT), cele implicate în coagulare şi fibrinoliză şi altele. În afecţiuni grave ale ficatului, acesta este incapabil să sintetizeze normal proteine, inclusiv enzime, astfel activităţile lor scad în raport cu valorile normale.

b) Enzime plasmatice nefuncţionale: teoretic, oricare enzimă celulară trebuie să fie prezentă şi în plasmă; numărul celor identificate este într-adevăr foarte mare. Prezenţa lor în plasmă se explică prin destrucţia celulară normală dar şi prin permeabilizarea membranelor în cursul eforturilor fizice, scăderea resurselor pentru producerea de energie şi altele. La persoanele sănătoase nivelul acestor enzime este aproape constant, el reprezentînd o stare staţionară între rata eliberării din celule şi inactivare. La cele mai multe dintre enzime acest nivel constant este foarte scăzut; ele au fost evidenţiate prin metode extrem de sensibile, posibile de efectuat cu aparatură costisitoare. Câteva zeci de

enzime pot fi însă dozate în plasmă cu suficientă precizie utilizând metode relativ simple. Dintre acestea s-au selecţionat un număr şi mai restrâns pentru dozare în scop de diagnostic; sunt enzime a căror concentraţie (activitate) creşte foarte mult în cursul destrucţiilor masive ale celulelor producătoare şi proporţional cu gravitatea leziunilor la nivelul ţesuturilor din care aceste enzime fac parte: inimă, ficat, muşchi scheletici şi altele. Un element important pentru ca enzimele plasmatice să aibă valoare diagnostică, dar şi de urmărire a eficacităţii tratamentului, este timpul în care activitatea lor devine semnificativ crescută, respectiv scăzută.

Se exemplifică cu enzimele serice care se dozează în legătură cu infarctul de miocard şi afecţiunile hepatice. În primul caz se dozează creatinkinaza (CK), glumatic-oxaloacetic-transaminaza (GOT) şi lactatdehidrogenaza (LDH). La toate există o creştere proporţională între mărimea zonei infarctate şi creşterea activităţii serice. Dozarea creatinkinazei este totuşi mai utilă pentru diagnostic deoarece chiar după 4-6 ore se remarcă o creştere a activităţii ei iar maximul este atins după 18 ore (la GOT şi LDH peste 24 ore). Situaţia este diametral opusă în ce priveşte durata de revenire a activităţii acestor enzime serice la valorile bazale (normale), de aceea evoluţia bolii se urmăreşte cel mai bine prin LDH.

Pentru diagnosticul afecţiunilor hepatice se practică, alături de alte investigaţii paraclinice, dozarea activităţii a peste zece enzime plasmatice nefuncţionale. Unele reflectă integritatea celulară, altele sunt în legătură cu diverse procese metabolice, altele redau capacitatea de sinteză a proteinelor şi acizilor nucleici şi în sfârşit capacitatea de excreţie. Este recomandată dozarea într-o anumită ordine (nivelele I, II, III şi IV); în prima instanţă, nivelul I, se recomandă dozarea GPT (glumatic-piruvic-transaminaza), GIDH, (glutamatdehidrogenaza) şi γGT (γ-glutamiltranspeptidaza).

Deosebit de util pentru diagnostic ar fi să existe pentru fiecare ţesut o enzimă extrem de specifică în ser. Un caz este fosfataza acidă a cărei creştere a activităţii este în legătură cu carcinomul de prostată. Pentru investigarea hepatică ar fi utilă dozarea activităţii sorbitoldehidrogenazei (SDH) şi a ornitin-carbamil-transferazei (OCT) care însă nu se practică curent din cauza unor dificultăţi tehnice.

Dificultăţi mari în investigarea paraclinică prin intermediul activităţii enzimelor serice apar, în primul rând, din faptul că cele mai multe enzime plasmatice nefuncţionale a căror activitate se poate determina, au provenienţă multiplă: LDH şi GOT provin din inimă, muşchi şi ficat, CK din inimă şi muşchii scheletici etc. O altă dificultate este legată de inactivarea rapidă în ser a unora dintre enzime.

Chiar şi în cazurile complicate, prin diverse strategii, medicul şi laboratorul de biochimie pot obţine totuşi rezultate foarte bune. Se menţionează determinarea simultană a mai multor enzime serice şi calculul unor raporturi (de exemplu, raportul De Rittis între GOT/GPT, care scade sub 1,3 în afecţiuni hepatice), dozarea activităţii enzimelor pe ţesuturi (recoltate prin biopsie), mai rar practicată. De mare valoare sunt determinările activităţilor izoenzimelor utilizând în acest scop procedee de separare (pe coloană, electroforetice) sau inhibarea cu anticorpi specifici a unora dintre izoenzimele unei enzime date. Astfel predominanţa în ser a formelor LDH_1 şi LDH_2 este un indiciu foarte bun pentru infarct de miocard, în timp ce predominanţa formei LDH_5 indică afecţiuni hepatice. În cazul CK, creşterea în ser nu numai a activităţii totale ci şi a activităţii izoenzimei de tip MB este indiciu sigur de infarct de miocard (forma MB fiind de provenienţă aproape strict miocardică).

Activitatea multor enzime plasmatice nefuncţionale se determină în relaţie cu bolile de metabolism (glucidic, lipidic şi proteic). Cele mai importante dintre acestea sunt prezentate în capitolele respective.

II.12. CLASIFICAREA ŞI DENUMIREA ENZIMELOR

Primelor enzime descoperite li s-au atribuit diverse denumiri; în cele mai multe cazuri numele enzimei s-a format din numele substratului prin adăugarea sufixului -ază: urează pentru enzima ce catalizează hidroliza ureei la CO_2 şi NH_3, arginază pentru enzima care catalizează hidroliza argininei la ornitină şi uree etc. Altor enzime li s-au atribuit denumiri particulare fără legătură cu reacţia catalizată: pepsină, tripsină, chimotripsină.

Când numărul enzimelor cunoscute a devenit foarte mare şi s-au acumulat date despre structură, coenzime, mecanism de acţiune etc., s-a impus atât introducerea unei clasificări raţionale cât şi a unor denumiri bazate pe criterii chimice care să evite confuziile. Acestea au fost elaborate, în anul 1961, de o comisie de enzimologie a Uniunii Internaţionale de Biochimie şi Biologie Moleculară (IUBMB) fiind în vigoare şi în prezent.

În sistemul de clasificare adoptat fiecare enzimă este încadrată într-o subclasă şi, eventual sub-subclasă care aparţine unei clase. Clasele, subclasele, sub-subclasele şi enzimele individuale se notează prin cifre despărţite de puncte. Sunt şase clase de enzime având în ordine numerele şi catalizând reacţiile:

1. Oxidoreductaze, catalizează reacţii de oxido-reducere;
2. Transferaze, catalizează transferuri de grupe ce conţin carbon, azot sau fosfor;
3. Hidrolaze, catalizează scindări de legături covalente cu participarea apei;
4. Liaze, catalizează ruperi ale legăturilor C-C, C-S şi C-N;
5. Izomeraze, catalizează toate tipurile de izomerizări, inclusiv racemizări;
6. Ligaze, catalizează formarea de legături între carbon şi O, S, N, cuplate cu hidroliza legăturilor macroergice.

Subclasele şi sub-subclasele sunt stabilite după tipul grupării sau legăturii care se modifică în cursul reacţiei, după natura coenzimei şi alte particularităţi.

Sistemul acesta de clasificare este deschis, orice enzimă nou descoperită putând fi introdusă într-o clasă, subclasă şi sub-subclasă.

Comisia a hotărât că se pot utiliza două modalităţi de denumire pentru enzime:

a) Numele „recomandat": se păstrează (sau se atribuie) denumiri cu sufixul -ază (glucozidază, zaharază, urează) sau se dă denumirea după acţiunea specifică (lactatdehidrogenază, adenilatciclază); pentru unele enzime se utilizează denumirile specifice (tripsina, pepsina).

b) Numele „sistematic": acesta este corelat cu numele clasei, subclasei şi sub-subclasei; el cuprinde denumirea substratului (substratelor), tipul reacţiei catalizate, coenzima, eventual alte caracteristici. Astfel fiecare enzimă are un cod specific. Utilizarea numelui sistematic este obligatorie doar în situaţiile care reclamă evitarea oricărei ambiguităţi (tipărituri, congrese etc.). Curent se utilizează denumirile recomandate.

Clasificarea şi denumirile sistematice ale enzimelor sunt redate în Tabelul II.4.

Tabelul II.4.

Fragmente din tabloul vast al clasificării enzimelor şi a denumirii sistematice a acestora

1. Oxidoreductaze
1.1. Care acţionează asupra grupării CH — OH
1.1.1. Cu coenzimă NAD^+ sau $NADP^+$
1.1.1.1. Alcool: NAD^+-oxidoreductază
1.1.1.27. L-lactat: NAD-oxidoreductază
1.2. Care acţionează asupra grupării C = O
1.2.1. Cu coenzimă NAD^+ şi $NADP^+$
1.2.1.12. D-gliceraldehid-3-fosfat: NAD-oxidoreductază
1.2.3. Cu O_2 ca acceptor
1.2.3.2. Xantină: oxigen-oxidoreductază
1.3. Care acţionează asupra legăturii CH — CH
1.3.2. Cu citocrom ca acceptor
1.4. Care acţionează asupra legăturii CH — NH
2. Transferaze
2.1. Care transferă fragmente de un carbon
2.1.1. Metil transferaze
2.1.1.10. S-adenozilmetionină: L-homocistein S-metiltransferază
3. Hidrolaze
3.1. Care scindează legături esterice
3.1.1. Carboxiesterhidrolaze
3.1.1.3. Glicerol-ester hidrolază
4. Liaze
4.1. Liaze C — C
5. Izomeraze
5.1. Racemaze şi epimeraze
6. Ligaze
6.1. Care asigură formarea legăturilor C — O

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. III VITAMINE ŞI COENZIME

III.1. GENERALITĂŢI

Vitaminele sunt o categorie de substanţe strict necesare animalelor superioare şi care nu pot fi sintetizate în organismul lor. De aceea, vitaminele trebuie să fie procurate de raţia alimentară.

În organismele superioare vitaminele nu reprezintă materiale structurale, de felul *principiilor imediate* (proteine, glucide, lipide) şi nu au valoare energetică dar împlinesc roluri funcţionale importante. Într-adevăr, majoritatea vitaminelor - sau derivaţi ai lor imediaţi - sunt *constituenţi coenzimatici*, participând la multiple şi variate reacţii metabolice. Pentru acest motiv, în capitolul de faţă se vor descrie şi ilustra asemenea intervenţii.

Deşi pentru împlinirea tuturor rolurilor funcţionale ale vitaminelor organismul omului are nevoie de cantităţi foarte mici (câteva miligrame sau chiar micrograme pe zi), raţia alimentară trebuie să le procure regulat. Altfel, ajung să se declanşeze anumite stări patologice specifice, numite *avitaminoze*.

Este de remarcat că există şi vitamine distincte din punct de vedere chimic - dar înrudite structural - care împlinesc aceleaşi funcţii şi a căror carenţă determină aceeaşi avitaminoză. Acestea se numesc *vitamere*. Spre exemplu, diverse vitamine E (tocoferoli) sunt caracterizate, una în raport cu alta, drept vitamere; astfel încât în loc de *vitaminele E* se poate spune şi *vitamerele E*.

În studiul vitaminelor se întâlneşte uneori şi termenul de *antivitamină* (sau antivitamine). Antivitaminele sunt substanţe cu acţiune antagonistă vitaminelor şi care produc efectele avitaminozelor respective. În principiu, fiecare vitamină poate avea una sau mai multe antivitamine.

III.2. CLASIFICAREA VITAMINELOR

Vitaminele au structuri chimice foarte variate. Din această cauză, ele nu s-au clasificat conform structurii ci s-a fixat drept criteriu de clasificare o însuşire fizică şi anume, solubilitatea.

Din punct de vedere al solubilităţii, vitaminele s-au grupat în două categorii: *vitamine hidrosolubile* (cele cu molecule polare, solubile în apă) şi vitamine *liposolubile* (cele cu molecule apolare, solubile în grăsimi). Prima categorie cuprinde vitaminele din complexul B (vitamina B_1, vitamina B_2, vitamina B_6, vitamina PP, vitamina B_{12}, acidul folic, biotina, acidul pantotenic) şi vitamina C. A doua categorie, cea a vitaminelor liposolubile, cuprinde: vitamina A, vitamina D, vitamina E şi vitamina K.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.3. VITAMINELE HIDROSOLUBILE ŞI ROLURILE LOR COENZIMATICE

III. 3.1. COMPLEXUL B

„Complexul B" este un grup de cel puţin 8 vitamine hidrosolubile (menţionate la clasificare) şi care se găsesc împreună în natură, fiind într-o strânsă inter-relaţie funcţională.

Toate vitaminele din complexul B sunt cofactori în diverse reacţii enzimatice; în special, ele joacă rol de coenzime în cele mai importante reacţii metabolice. Acest rol este ilustrat - pentru fiecare vitamină - în cele ce urmează.

Vitamina B_1 (*tiamina*) şi coenzima *tiaminpirofosfat.*

Vitamina B_1, sau tiamina, cuprinde în molecula sa două nuclee heterociclice (pirimidinic şi tiazolic). Ambele nuclee sunt substituite în anumite poziţii şi sunt unite printr-o punte metilenică:

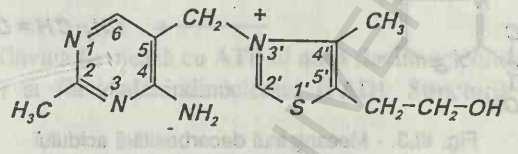


Fig. III.1. - Vitamina B_1 (tiamina)

În organism - la nivelul ficatului, rinichiului şi inimii — molecula vitaminei B_1 este combinată cu resturi de acid fosforic şi proteine specifice (în prezenţa ionilor Mn^{2+}) pentru a da naştere la coenzime şi enzime active, participante la metabolismul glucidelor. Intr-adevăr, în celulele diverselor organe şi ţesuturi tiamina se află sub formă de ester pirofosforic, tiaminpirofosfat (TPP). El rezultă din reacţia tiaminei cu ATP:

$$\text{Tiamina} + \text{ATP} \longrightarrow \text{TPP} + \text{AMP}$$

Această reacţie este catalizată de enzima tiamin difosfotransferază, aflată - în special - în creer şi ficat.

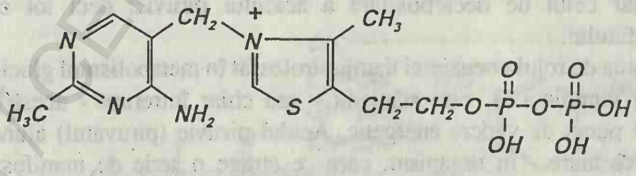


Fig. III.2. - Tiaminpirofosfatul (TPP)

Tiaminpirofosfatul este *coenzimă* în reacţii enzimatice de transfer ale unei unităţi de aldehidă activă. Asemenea transferuri au loc în reacţii de decarboxilare oxidativă a α-ceto-acizilor (piruvat, α-cetoglutarat) şi în reacţii de transcetolare. Ambele tipuri de reacţii sunt întâlnite în metabolismul glucidic. În aceste reacţii de transfer rolul propriuzis al coenzimei TPP este de a servi la eliberarea din anumite molecule a unităţilor

aldehidice care urmează să fie transferate pe alte molecule. Se ilustrează aici intervenţia tiaminpirofosfatului în decarboxilarea acidului piruvic şi formarea de acetaldehidă(în vitro).

Datorită poziţiei sale în ciclul tiazolic din tiaminpirofosfat C_2' este reactiv; în urma ionizării H legat de el devine H^+ iar C_2' carbanion. Acest carbanion exercită un atac nucleofil asupra C_2 din molecula acidului piruvic. Ca urmare, rezultă un compus de adiţie al acidului piruvic la tiaminpirofosfat şi care se decarboxilează, formându-se hidroxietil — tiaminpirofosfat. Ulterior, acesta eliberează molecula de acetaldehidă (rezultată din hidroxietilul format prin decarboxilarea acidului piruvic) şi regenerează tiaminpirofosfatul.

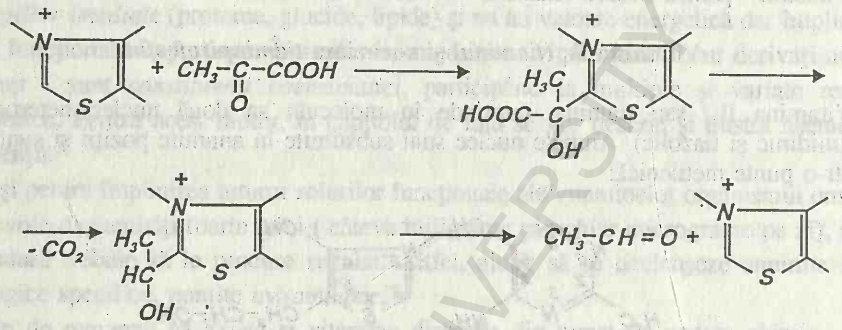


Fig. III.3. - Mecanismul decarboxilării acidului piruvic (în vitro)

În organism, această *reacţie - cheie* de decarboxilare a acidului piruvic este catalizată de un complex multienzimatic, al piruvat dehidrogenazei, în care - pe lângă tiaminpirofosfat - participă încă patru coenzime: acidul lipoic, acetil-CoA, NAD^+ şi FAD. La studiul metabolismului glucidic se prezintă mecanismul întregii reacţii complexe, ilustrându-se în totalitate transferul acetaldehidei rezultate din decarboxilarea acidului piruvic.

Decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului, precum şi a derivaţilor α - cetocarboxilici proveniţi din aminoacizi cu catenă ramificată, se realizează printr-un mecanism absolut similar celui de decarboxilare a acidului piruvic; deci tot cu participarea tiaminpirofosfatului.

Ţinând seama de rolul coenzimei tiaminpirofosfat în metabolismul glucidic, se înţelege că în carenţa vitaminei B_1 este stânjenit - sau chiar întrerupt - acest proces atât de important din punct de vedere energetic. Acidul piruvic (piruvatul) ajunge astfel să se acumuleze - ca atare - în organism, ceea ce atrage o serie de manifestări patologice resimţite, în special, la nivelul sistemului nervos.

Este de remarcat că în deficienţa de tiamină, pe lângă acidul piruvic ajung să se acumuleze în organism şi alte substanţe (α-cetoacizi sau pentoze) care în mod normal participă la reacţii de decarboxilare sau transcetolare prin intervenţia coenzimei tiaminpirofosfat. Concentrarea acestor substanţe în cantităţi mai mari decât cele normale antrenează - de asemenea - diverse tulburări metabolice.

Vitamina B_2 (*riboflavina*) şi coenzimele flavinice

Vitamina B_2 se mai numeşte riboflavină, datorită structurii sale de flavină (pigment galben) cu radical ribitil, provenit din ribitol (polialcoolul corespunzător ribozei). Acest radical este substituit în poziţia 9 a heterociclului izoaloxazinic din molecula riboflavinei. În poziţiile 6 şi 7 ale aceluiaş heterociclu sunt substituiţi radicali metil:

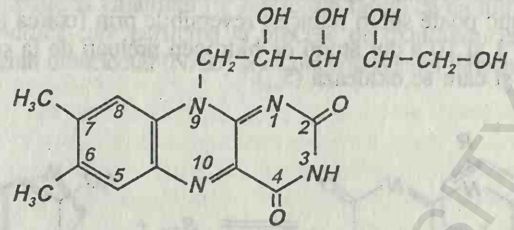


Fig. III.4. - Vitamina B_2 (riboflavina)

În organism riboflavina formează cu ATP-ul două flavinnucleotide numite: flavinmononucleotid (FMN) şi flavinadenindinucleotid (FAD). Structurile lor chimice sunt următoarele:

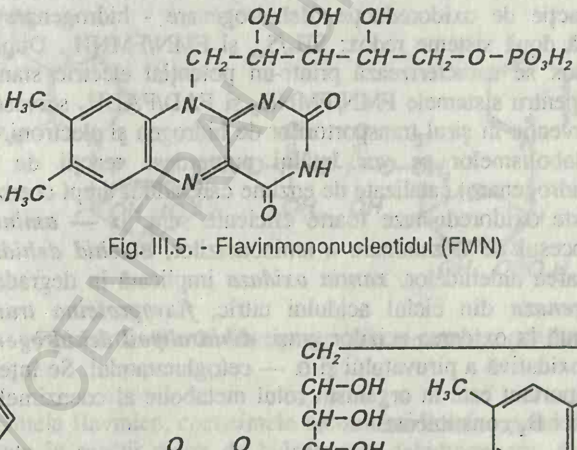


Fig. III.5. - Flavinmononucleotidul (FMN)

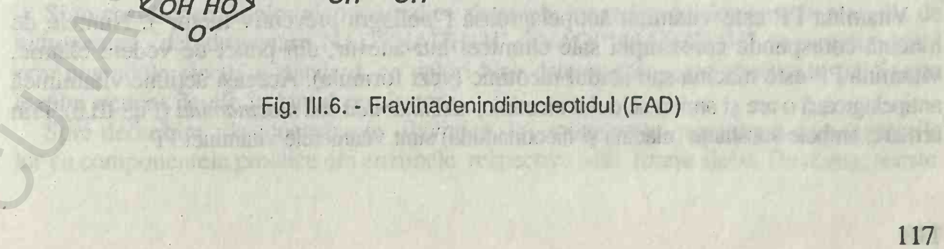
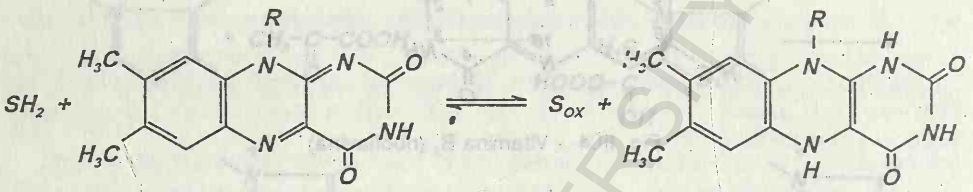


Fig. III.6. - Flavinadenindinucleotidul (FAD)

Ambele flavinnucleotide (FMN şi FAD) sunt coenzime care fac parte din sisteme enzimatice implicate în diverse procese de oxidoreducere din organism. Datorită structurii coenzimelor respective, aceste enzime se mai numesc *flavoenzime* sau *flavoproteine*. În structura lor se remarcă o legătură strânsă, dar necovalentă, între coenzimă şi partea proteică. De asemenea, majoritatea flavoproteinelor conţin metale (Mo, Fe) cu rol de cofactori adiţionali. De aceea, enzimele corespunzătoare sunt cunoscute şi sub numele de *metaloflavoproteine*.

În reacţiile de oxidoreducere catalizate de flavoproteinele active, participantele directe la procesele redox sunt tocmai coenzimele constituente, FMN sau FAD. Într-adevăr, ciclul lor izoaloxazinic poate suferi reduceri reversibile prin fixarea temporară la atomii de azot din poziţiile 1 şi 10 a doi atomi de hidrogen preluaţi de la substratele (SH_2) cu care intră în reacţie şi care se oxidează (S_{ox}).



FMN sau FAD — $FMNH_2$ sau $FADH_2$

Fig. III.7. - Reducerea nucleului izoaloxazinic în flavin-nucleotide

În acest mod FMN sau FAD trec din formele lor oxidate în formele reduse, $FMNH_2$ sau $FADH_2$.

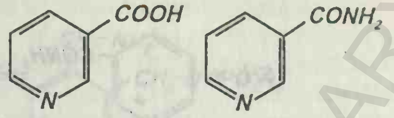
Ca în orice reacţie de oxidoreducţie (dehidrogenare - hidrogenare) şi în reacţia anterioară participă două sisteme redox: SH_2/S_{ox} şi FMN/$FMNH_2$. După cum se ştie, fiecare sistem redox se caracterizează printr-un potenţial electric standard. Valorile acestor potenţiale pentru sistemele FMN/$FMNH_2$ şi FAD/$FADH_2$ servesc la precizarea locului lor de intervenţie în şirul transportorilor de hidrogen şi electroni.

În studiul metabolismelor se vor întâlni numeroase reacţii de oxidoreducere (dehidrogenare - hidrogenare) catalizate de enzime care admit drept coenzime FMN sau FAD. Printre aceste oxidoreductaze foarte eficiente sunt: α — ***aminoacid oxidaza*** participantă la procesul de dezaminare a aminoacizilor, ***aldehid dehidrogenaza*** care catalizează degradarea aldehidelor, ***xantin oxidaza*** implicată în degradarea purinelor, ***succinat dehidrogenaza*** din ciclul acidului citric, ***flavoproteina transportoare de electroni*** participantă la oxidarea acizilor graşi, ***dihidrolipoil dehidrogenaza*** implicată în decarboxilarea oxidativă a piruvatului şi α — cetoglutaratului. Se înţelege, în aceste condiţii, cât de important este în organism rolul metabolic al coenzimelor flavinice şi implicit, al vitaminei B_2 constituente.

Vitamina PP *(niacina)* şi coenzimele nicotinamidice

Vitamina PP este vitamina antipelagroasă ("*p*ellagra *p*reventiv factor"). Numele de niacină corespunde constituţiei sale chimice. Într-adevăr, din punct de vedere chimic, vitamina PP este niacina sau acidul nicotinic (vezi formula). Aceeaşi acţiune vitaminică antipelagroasă o are şi amida acidului nicotinic, *nicotinamida* sau *niacinamida* (Fig. III.8). Prin urmare, ambele substanţe (niacina şi nicotinamida) sunt vitamerele vitaminei PP.

Fig. III.8. - Niacina şi niacinamida



Acid nicotinic (niacina)   *Nicotinamida (niacinamida)*

Principalul rol metabolic al vitaminei PP reiese din faptul că ea intră în structura a două *coenzime nicotinamidice* care participă la procese de oxidoreducere. Aceste coenzime sunt: nicotinamidadenin dinucleotid (NAD) şi nicotinamidadenin dinucleotidfosfat (NADP):

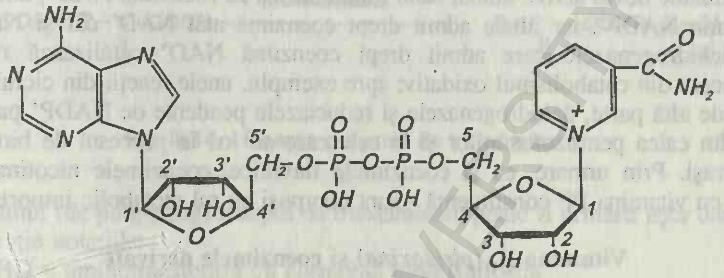


Fig. III.9. - Nicotinamidadenin dinucleotid (NAD^+)

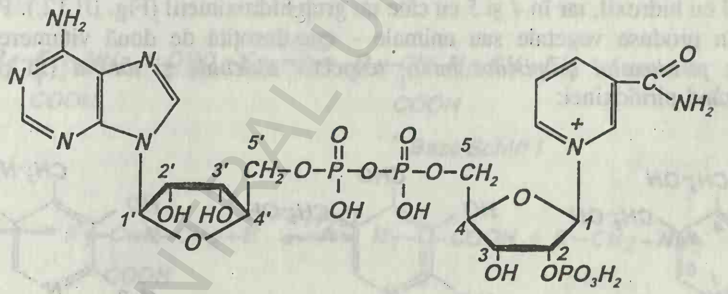


Fig. III.10. - Nicotinamidadenin dinucleotidfosfat ($NADP^+$)

Ca şi coenzimele flavinice, coenzimele nicotinamidice fac parte din constituţia unor enzime implicate în reacţii redox de hidrogenare-dehidrogenare. Această capacitate a nucleotidelor pridinice se datorează însăşi nucleului piridinic pe care-l conţin şi la nivelul căruia are loc fixarea hidrogenului de la substrat (Fig. III.11).

Şi în cazul coenzimelor nicotinamidice sistemele lor redox participante la reacţiile de hidrogenare - dehidrogenare, $NAD^+/NADH+H^+$ şi $NADP^+/NADPH+H^+$, se caracterizează prin potenţiale electrice standard, cu valori bine determinate, care servesc la precizarea locului ocupat de ele în lanţul respirator.

Spre deosebire de coenzimele flavinice, la conezimele nicotinamidice legăturile lor cu componentele proteice din enzimele respective sunt foarte slabe. De aceea, aceste

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

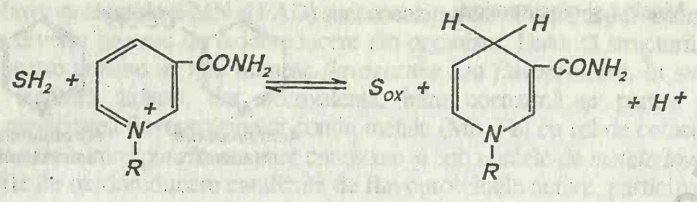


Fig. III.11. - Reducerea nucleului piridinic în coenzimele nicotinamidice

coenzime pot trece uşor pe mai multe proteine enzimatice (apoenzime). Este de remarcat că unele enzime devin active numai când funcţionează cu coenzima NAD^+, altele numai cu coenzima $NADP^+$, iar altele admit drept coenzimă atât NAD^+ cât şi $NADP^+$. În genere, dehidrogenazele care admit drept coenzimă NAD^+ catalizează reacţii de oxidoreducere din catabolismul oxidativ; spre exemplu, unele reacţii din ciclul acidului citric. Pe de altă parte, dehidrogenazele şi reductazele pendente de $NADP^+$ participă la reacţiile din calea pentozofosfaţilor şi la cele care au loc în procesul de biosinteză a acizilor graşi. Prin urmare, ca şi coenzimele flavinice, coenzimele nicotinamidice - împreună cu vitamina PP constituentă - sunt compuşi cu rol metabolic important.

Vitamina B_6 *(piridoxina)* şi coenzimele derivate

Numele de piridoxină corespunde constituţiei chimice a vitaminei B_6 deoarece ea este un alcool cu nucleu piridinic. Acest nucleu este substituit în patru poziţii astfel: în *2* cu metil, în *3* cu hidroxil, iar în *4* şi *5* cu câte un grup hidroximetil (Fig. III.12.). Piridoxina - aflată în produse vegetale sau animale - este însoţită de două vitamere înrudite structural: *piridoxalul* şi *piridoxamina*, respectiv *aldehida* şi *amina* (în poziţia 4) corespunzând piridoxinei:

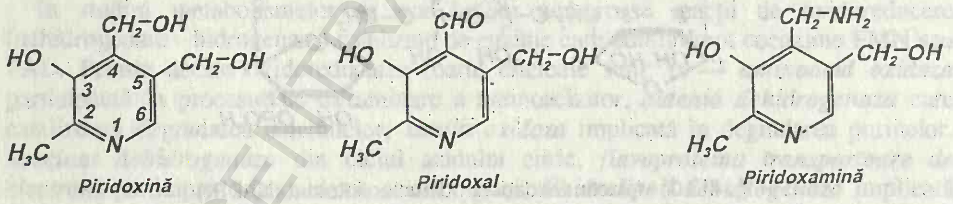


Fig. III.12. - Structurile chimice ale celor trei conpuşi piridinici cu activitate de vitamină B_6

În citoplasmă aceste trei vitamere devin substrate faţă de enzima piridoxal kinază care catalizează reacţii de fosforilare cu ATP-ul pentru fiecare. Ca urmare, ele trec în esterii fosforici corespunzători (la grupul de alcool primar din poziţia 5). Dintre aceşti esteri, piridoxalfosfatul şi piridoxaminfosfatul sunt *coenzime* participante la diverse reacţii metabolice; în special, la transaminarea, decarboxilarea şi trans-sulfurarea α - aminoacizilor.

În procesul transaminării, piridoxalfosfatul şi piridoxaminfosfatul intervin pentru transformarea - după caz - a unui aminoacid în cetoacid şi invers:

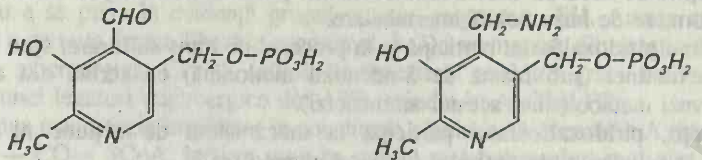


Fig. III.13. - Piridoxalfosfatul şi piridoxaminfosfatul

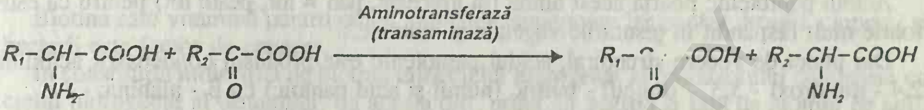


Fig. III.14. - Reacţia generală de transaminare

Mecanismul (de ping-pong) reacţiei de transaminare poate fi urmărit uşor dacă se iau în consideraţie notaţiile:

E — CHO = aminotransferaza cu coenzimă piridoxalfosfat

E — CH_2NH_2 = aminotransferaza cu coenzimă piridoxaminfosfat

şi dacă se ţine seama de intervenţia succesivă a celor două coenzime în reacţii reversibile:

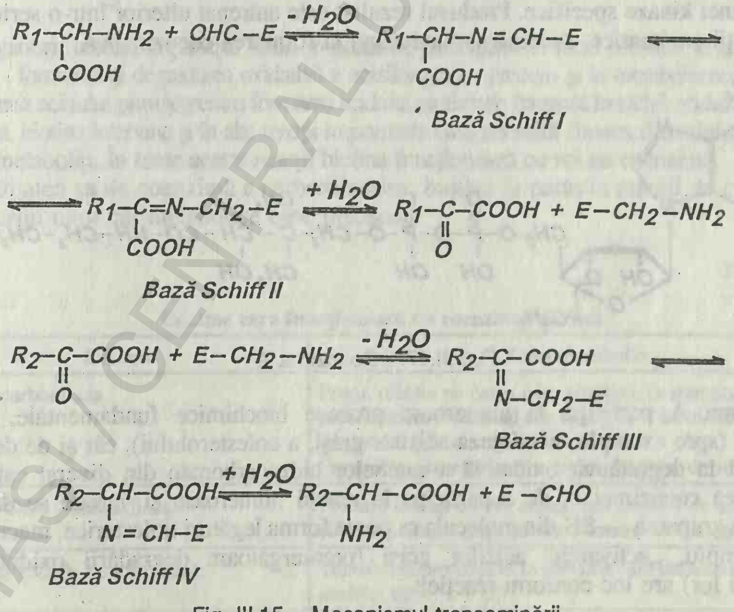


Fig. III.15. - Mecanismul transaminării

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor, piridoxalfosfatul joacă rol de coenzimă tot prin formare de baze Schiff intermediare.

Coenzima piridoxalfosfat participă și la procesul de trans-sulfurare; spre exemplu, la reacția metioninei (sub formă de S-adenozil metionină) cu serina din care rezultă cisteina (vezi metabolismul acestor aminoacizi).

În sfârșit, piridoxalfosfatul participă la mecanismul de acțiune al fosforilazei implicată în scindarea glicogenului (vezi „glicogenoliza").

Acidul pantotenic și coenzima A

Acidul pantotenic poartă acest nume (în grecește, pan = tot, peste tot) pentru că este foarte mult răspândit în țesuturile vegetale și animale.

Din punct de vedere structural, acidul pantotenic este produsul condensării acidului 2,4 - dihidroxi - 3,3' - dimetil - butiric (numit și acid pantoic) cu β - alanina:

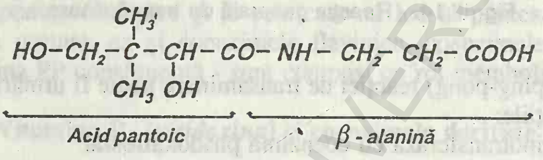


Fig. III.16. - Acidul pantotenic

În majoritatea organelor acidul pantotenic este fosforilat pe seama ATP-ului, sub acțiunea unei kinaze specifice. Produsul rezultat este antrenat ulterior într-o serie de alte patru reacții enzimatice, succesive, conducând la formarea coenzimei A:

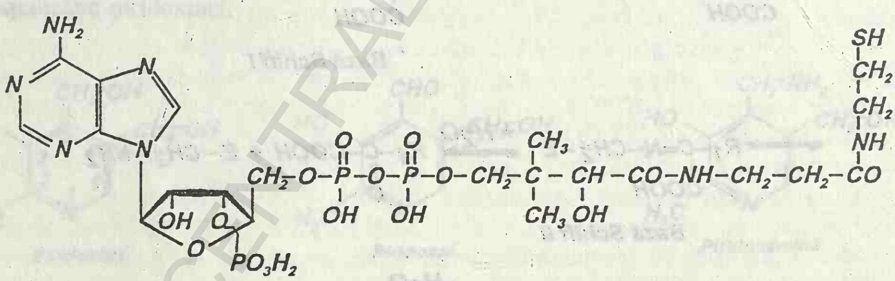


Fig. III.17. - Coenzima A

Coenzima A participă la numeroase procese biochimice fundamentale, atât de biosinteză (spre exemplu, biosinteza acizilor grași, a colesterolului), cât și de degradare (în special la degradarea oxidativă a catenelor hidrocarbonate din diverși cataboliți). Posibilitatea coenzimei A de a participa la reacții numeroase și variate se datorează faptului că gruparea — SH din molecula sa poate forma legături tiolesterice, macroergice. Spre exemplu, „activarea" acizilor grași (premergătoare degradării oxidative sau biosintezei lor) are loc conform reacției:

$$R - COOH + CoA - SH + ATP \longrightarrow R - CO \sim SCoA + AMP + PP_i$$

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se observă că în reacţie s-a prescurtat structura coenzimei A libere sub forma CoA - - SH pentru a se pune în evidenţă grupul reactiv, respectiv - SH. Acesta este modul obişnuit de a se nota forma liberă a coenzimei A. De asemenea, din reacţie se observă că legătura macroergică, C ~ S (aflată în tiolesterul acidului gras) s-a format prin desfacerea unei legături macroergice din ATP (scindat în AMP şi PP_i).

Un compus macroergic important în constituţia căruia intră coenzima A este acetil — CoA, CH_3 — CO ~ SCoA, întâlnit mult în studiul metabolismelor; mai ales, în cadrul metabolismului glucidic şi lipidic.

Biotina şi rolul ei coenzimatic

Biotina este vitamină pentru om şi animalele superioare iar pentru drojdii, ciuperci şi bacterii este factor de creştere.

În constituţia moleculei de biotină intră ciclul hidrogenat al imidazolului condensat cu ciclul hidrogenat al tiofenului. La acesta din urmă, în poziţia α faţă de atomul de sulf, se află ataşat (prin substituire) radicalul acidului valerianic:

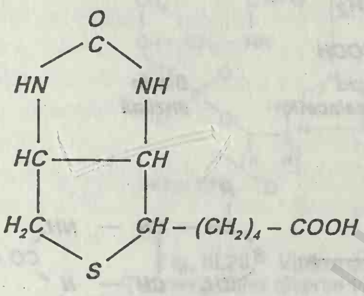


Fig. III.18 - Biotina

În organism biotina împlineşte roluri importante, participând în mod constant la metabolismul lipidelor - formarea şi degradarea oxidativă a acizilor graşi - precum şi la metabolismul glucidelor: carboxilarea acidului piruvic pentru formarea acidului oxalacetic (prezent în ciclul acidului citric). De asemenea, biotina intervine şi în alte reacţii importante care necesită fixarea dioxidului de carbon pe unii metaboliţi. În toate aceste reacţii biotina funcţionează cu rol de coenzimă.

În calitatea sa de coenzimă a carboxilazelor, biotina ia parte la reacţii de *carboxilare* care aparţin unor căi metabolice bine precizate:

Tabelul III. 1

Enzime care funcţionează cu coenzima biotină

Enzima	*Rolul metabolic*
Piruvat carboxilaza	Prima reacţie pe calea care conduce la transformarea precursorilor - rezultaţi din unităţi cu 3 atomi de carbon - în glucoză (gluconeogeneză). Procură oxalacetat pentru ciclul acidului citric.
Acetil - CoA - carboxilaza	Procură unităţi cu doi atomi de carbon - de acetat - în sinteza acizilor graşi pentru formare de malonil - CoA.
Propionil - CoA - carboxilaza	Transformă propionatul în succinat care intră apoi în ciclul acidului citric
β - Metil - crotonil - CoA - carboxilaza	Intervine în catabolismul leucinei şi al unor compuşi isoprenoidici

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se ilustrează aici rolul coenzimatic al biotinei în carboxilarea acidului piruvic. Reacţia generală este:

$$\underset{\text{acid piruvic}}{CH_3 - CO - COOH} + CO_2 \longrightarrow \underset{\text{acid oxalacetic}}{HOOC - CH_2 - CO - COOH}$$

Trebuie subliniat faptul că la reacţie dioxidul de carbon participă numai sub formă activată, adică unit cu biotina. În această etapă a reacţiei iau parte: HCO_3^-, ATP, Mg^{2+} şi acetil - CoA (cu rol de efector alosteric). Ulterior, grupul carboxil activat este transferat la acidul piruvic.

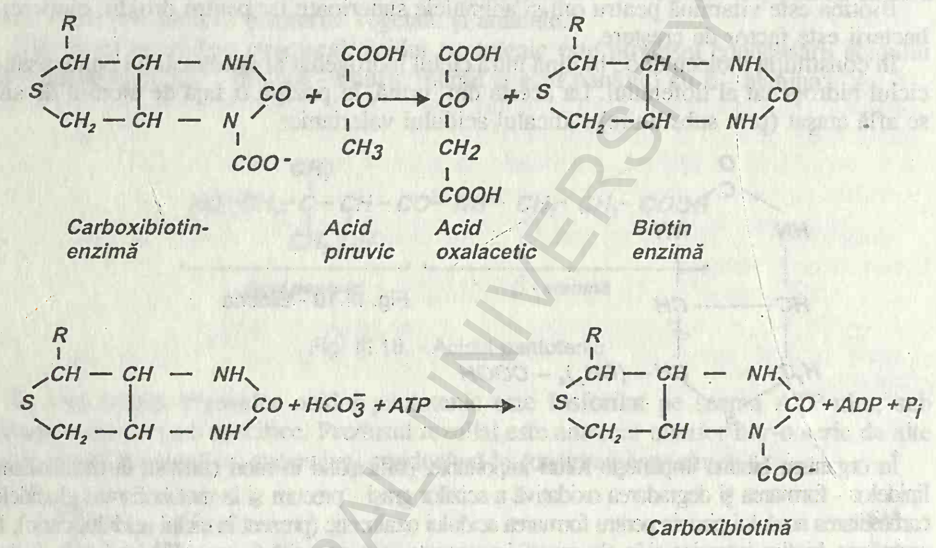


Fig. III.19. - Mecanismul carboxilării acidului piruvic

Vitamina B_{12} (*cianocobalamina*) şi rolul ei coenzimatic.

Vitamina B_{12} împlineşte rol de vitamină antipernicioasă pentru om şi este factor de creştere pentru microorganisme. Poartă indicele *12* fiind considerată al 12-lea produs izolat din complexul B. Numele de „cianocobalamină" este datorat constituţiei sale chimice deoarece conţine în moleculă o grupare *cian* şi un ion de *cobalt* (Fig. III.20).

Există şi alte substanţe cu acţiune de vitamină B_{12} (vitamere) care au structuri asemnănătoare cianocobalaminei. Ele se deosebesc de aceasta prin faptul că în locul grupării — CN cuprind o altă grupare funcţională electronegativă (nitro, hidroxil), radicalul metil sau chiar un rest de deoxiadenozină.

În ficat, la omul sănătos, se găsesc obişnuit trei compuşi cobalaminici: metil-, hidroxi- şi deoxiadenozil - cobalamina. Aceşti compuşi - sau vitamina B_{12} ca atare - iau parte, cu rol de coenzime, în procese metabolice esenţiale din organism. În special, ele sunt coenzime pentru unele transmetilaze şi anumite izomeraze (mutaze).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

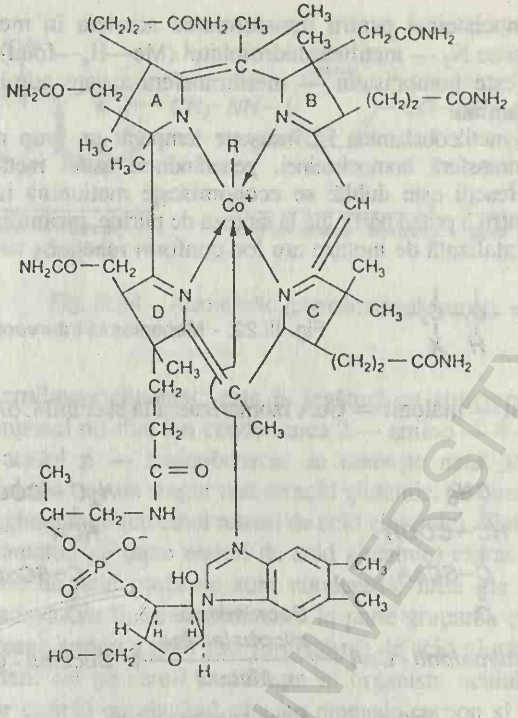


Fig. III.20. - Vitamina B_{12} (ciancobalamina)
R variază dând diverse vitamere ale vitaminei B_{12} :
R = CN în ciancobalamină, R = OH în hidroxicobalamină,
R = 5' deoxiadenozil în 5' — deoxiadenozilcobalamină şi R = CH_3, în metilcobalamină.

Se exemplifică aici, în primul rând, participarea metilcobalaminei, în calitate de coenzimă a unei transferaze, la reacţia de transformare a homocisteinei în metionină. În al doilea rând, se pune în evidenţă mecanismul de intervenţie al mutazelor şi se ilustrează participarea deoxiadenozilcobalaminei -- cu rol de coenzimă - în reacţia de transformare a L — metil — malonil — CoA în succinil — CoA:.

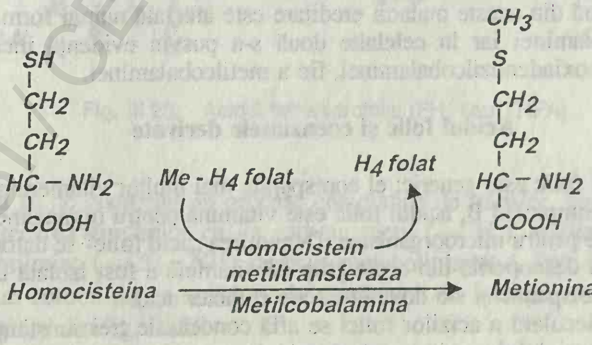


Fig. III.21. - Rolul coenzimatic al metilcobalaminei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1) Metilarea homocisteinei pentru transformarea acesteia în metionină are loc în citoplasmă utilizându-se N_5 — metiltetrahidrofolatul (Me—H_4—folat) ca donor de metil. Enzima catalizantă este homocistein — metiltransferaza care admite drept coenzimă specifică metilcobalamina.

În această reacţie metilcobalamina îşi însuşeşte temporar un grup metil de la donorul Me—H_4—folat şi-l transferă homocisteinei, generându-se astfel metionina. Semnificaţia metabolică a acestei reacţii este dublă: se economiseşte metionina iar tetrahidrofolatul devine disponibil pentru a putea participa la sinteza de purine, pirimidine şi acizi nucleici.

2) Izomerizarea catalizată de mutaze are loc conform reacţiei:

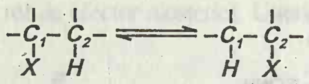


Fig. III.22. - Mecanismul intervenţiei mutazelor

În cazul L — metil — malonil — CoA izomerizarea la succinil CoA decurge conform reacţiei:

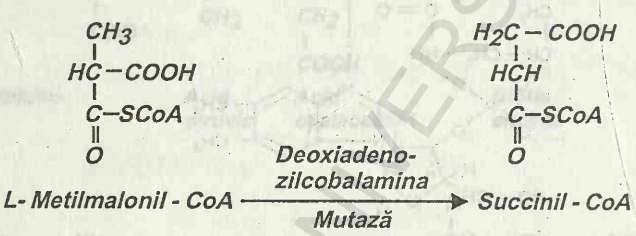


Fig. III.23. - Rolul coenzimatic al deoxiadenozilcobalaminei

fiind catalizată de enzima L — metilmalonil — CoA mutaza care funcţionează cu coenzima sa specifică, deoxiadenozilcobalamina.

Este de remarcat că deficienţa de vitamină B_{12} se poate resimţi până la nivelul acestor reacţii. Astfel, în primul caz, homocisteina rămâne nemetilată şi ajunge să se elimine prin urină (homocistinurie) iar în al doilea caz, pentru acelaş motiv, acidul L — metil — malonic se elimină tot prin urină (acidurie metilmalonică).

Există şi patru tulburări metabolice ereditare caracterizate prin incapacitatea organismului de a folosi vitamina B_{12} cu rol de coenzimă în reacţii de felul celor ilustrate mai înainte. În două din aceste maladii ereditare este afectată numai formarea (sinteza) deoxiadenozilcobalaminei iar în celelalte două s-a pus în evidenţă incapacitatea de constituire fie a deoxiadenozilcobalaminei, fie a metilcobalaminei.

Acidul folic şi coenzimele derivate

Numele de acid folic este generic; el corespunde mai multor vitamere ale sale. Ca şi alte vitamine din complexul B, acidul folic este vitamină pentru organismele superioare şi factor de creştere pentru microorganisme. Denumirea „acid folic" se datorează faptului că prima substanţă descoperită din acest grup de vitamine a fost izolată din frunze (în latineşte „folia") de spanac şi s-a dovedit că are caracter acid.

În structura moleculară a acizilor folici se află condensate trei sunstanţe: un derivat trisubstituit al heterociclului numit *pteridină*, acidul p — aminobenzoic şi acidul glutamic:

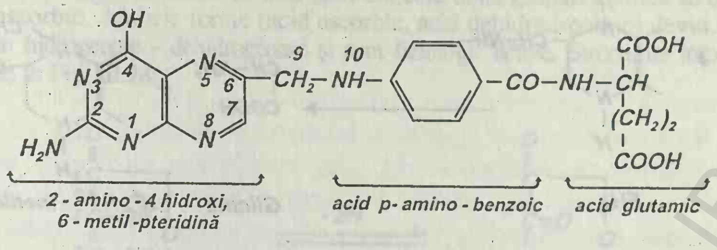


Fig. III.24. - Acidul folic (pteroilmonoglutamat)

Numele de „pteroilmonoglutamat" este în legătură cu structura chimică a acidului folic, deoarece compusul rezultat din condensarea 2 — amino — 4 — hidroxi — 6 metil — pteridinei cu acidul p — aminobenzoic se numeşte *acid pteroic* şi acesta este condensat -la rândul său - cu un singur rest de acid glutamic. Se cunosc însă alţi doi acizi folici: pteroilpentaglutamatul (cu cinci resturi de acid glutamic) aflat în ficatul animalelor şi pteroilheptaglutamatul (su şapte resturi de acid glutamic) extras din plante. În aceşti acizi folici resturile de acid glutamic sunt condensate între ele într-un mod special (neobişnuit). Intr-adevăr, la fiecare condensare ia parte gruparea carboxil din poziţia γ a unui rest şi gruparea amino a altui rest (următorul) de acid glutamic.

Cel mai important rol pe care-l împlineşte în organism acidul folic este acela de transportor al unor entităţi cuprinzând câte un atom de carbon şi care sunt folosite în multiple biosinteze. Însă, pentru a putea îndeplini această funcţie, acidul folic este — în prealabil — hidrogenat în compusul H_4 — folat, sub acţiunea folat — reductazelor care utilizează ca donor de hidrogen $NADPH+H^+$. Reducerea are loc la nivelul dublelor legături 5-6 şi 7-8 din nucleul pteridinic al acidului folic propriu-zis (pteroilmonoglutamat):

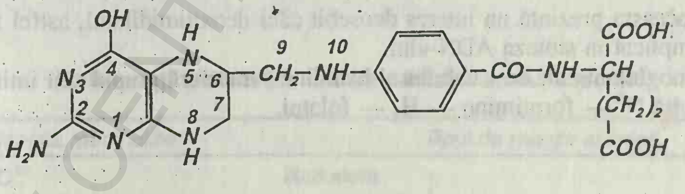
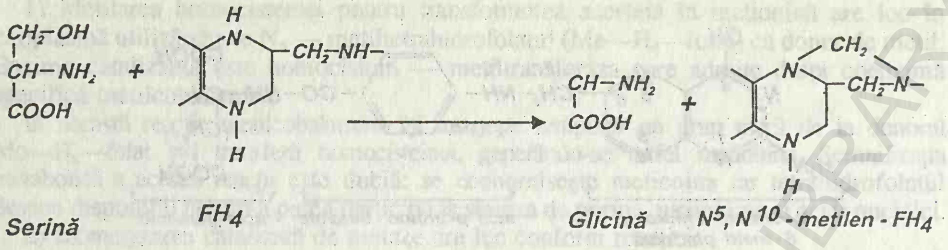


Fig. III.25. - Acidul tetrahidrofolic (FH_4 sau THFA)

În calitatea sa de coenzimă în procese enzimatice de transfer, acidul tetrahidrofolic participă la trecerea grupărilor cu un carbon: metil ($—CH_3$), metilen ($>CH_2$), formil (—CHO), formimino (—CH = NH), de la un metabolit la altul. Spre exemplu, transferul grupului cu un carbon de pe serină pe homocisteină cu formare de metionină are loc conform reacţiilor din fig. III.26.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



N^5, N^{10} - metilen - FH_4 + NADH + $H^+ \rightleftharpoons N^5$ - metil - FH_4 + NAD^+

N^5, - metil - FH_4 + homocisteină $\rightleftharpoons FH_4$ + metionină

Fig.III.26. - Participarea acidului tetrahidrofolic, cu rol coenzimatic, la formarea metioninei

După cum s-a arătat la vitamina B_{12}, ultima reacţie din Fig. III.26 are loc cu participarea coenzimatică a cobalaminei, pentru transferul grupului — CH_3 (Fig. III.21).

N^5, N^{10} — metilen H_4F, participant la reacţie are rol coenzimatic şi în cedarea unui grup metil deoxiuridilatului pentru a-l transforma în deoxitimidilat:

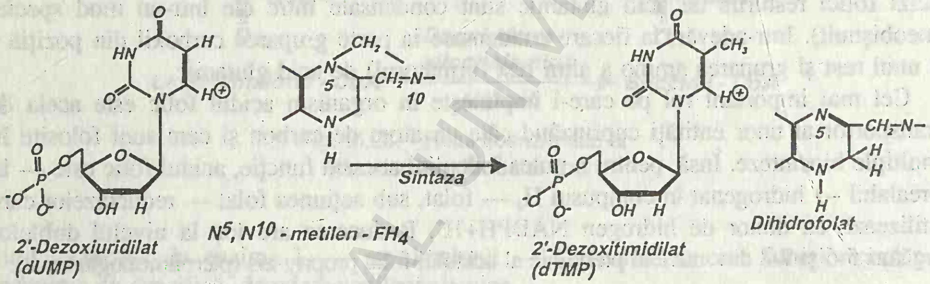


Fig. III.27. - Rolul coenzimatic al acidului tetrahidrofolic la formarea deoxitimidilatului

Reacţia aceasta prezintă un interes deosebit căci deoxitimidilatul, astfel format, este precursor implicat în sinteza ADN-ului.

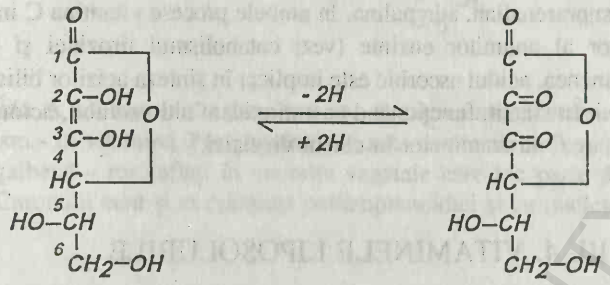
Formiminoglutamatul, un catabolit al histidinei, transferă grupul său imino la H_4 — folat şi rezultă N^5 — formimino — H_4 — folatul.

III. 3.2. VITAMINA C (ACIDUL ASCORBIC)

Vitamina C poartă şi numele de acid ascorbic (a - fără, *scorbic* = rădăcina cuvântului scorbut) deoarece este o substanţă acidă (acid organic) şi vindecă boala numită scorbut.

Structura moleculei de acid ascorbic este înrudită cu cea a hexozelor. De fapt, el poate fi considerat drept γ - lactona unui acid hexuronic, numit acid L - gulonic. În moleculă mai sunt cuprinse şi patru grupări - OH: două alcoolice (la C_5 şi C_6) şi două enolice (la C_2 şi C_3). Atomul de carbon C_5 are configuraţie stângă.

Prin îndepărtarea atomilor de hidrogen din cele două grupări enolice se obţine acidul dehidroascorbic. Ambele forme (acid ascorbic, acid dehidroascorbic) devin interconvertibile prin hidrogenare - dehidrogenare şi sunt fiziologic active. Structurile lor chimice sunt prezentate în Fig. III.28.



Acid L - ascorbic *Acid L - dehidroascorbic*

Fig. III.28. - Acidul L-ascorbic şi acidul L-dehidroascorbic

Ca atare sau sub formă oxidată, vitamina C participă la reacţii multiple pe care le suferă în organism diverse categorii de compuşi importanţi din punct de vedere biochimic: aminoacizi, nucleotide, hormoni, vitamine, coenzime, ioni metalici.

Majoritatea reacţiilor care au loc cu participarea acidului ascorbic (forma redusă) sunt hidroxilări în care este implicat şi oxigen molecular:

$$R - H + \text{Ac. ascorbic} + O_2 \longrightarrow R - OH + \text{Ac. dehidroascorbic} + H_2O$$

Se cunosc însă şi hidroxilări care se fac pe seama acidului dehidroascorbic. În aceste cazuri, odată cu hidroxilarea altei substanţe are loc şi reducerea formei oxidate a acidului ascorbic. Alte ori, reacţiile la care participă acidul ascorbic (forma redusă) constau numai în reduceri. În tabelul III.2. se menţinează câteva reacţii metabolice în care intervine acidul ascorbic (forma redusă sau oxidată), precizându-se totodată şi tipul de reacţie corespunzător.

Tabelul III.2

Unele reacţii metabolice la care participă acidul ascorbic

Reacţia metabolică	*Tipul de reacţie chimică*	
1/2 O_2 —> O^{2-}	Reducere	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
Citocrom a(c) Fe^{3+} —> Citrocrom a(c) Fe^{2+}	Reducere	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
Methemoglobină —> Hemoglobină	Reducere	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
Acid folic —> acid tetrahidrofolic	Reducere	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
* Prolină —> hidroxiprolină	Hidroxilare	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
* Lizină —> hidroxilizină	Hidroxilare	Cu participarea acidului ascorbic (forma redusă)
Triptofan —> 5 - hidroxitriptofan	Oxidare cu participarea acidului dehidroascorbic	

* Reacţii importante în biosinteza colagenului

Pe lângă reacţiile menţionate în tabelul precedent, acidul ascorbic intervine şi în diverse alte reacţii de oxidoreducere în care funcţionează cuplat cu glutationul sau coenzimele nicotinamidice şi flavinice. Un rol important îl are acidul ascorbic în degradarea oxidativă a aminoacidului tirozină precum şi în formarea (tot din tirozină) a hormonului medulosuprarenalian, adrenalina. În ambele procese vitamina C intervine ca un cofactor activator al anumitor enzime (vezi catabolismul tirozinei şi biosinteza adrenalinei). De asemenea, acidul ascorbic este implicat în sinteza acizilor biliari precum şi în absorbţia fierului. În sfârşit, funcţionând ca antioxidant hidrosolubil, acidul ascorbic poate inhiba dezvoltarea nitrozaminelor în cursul digestiei.

III. 4. VITAMINELE LIPOSOLUBILE

Spre deosebire de vitaminele hidrosolubile, cele liposolubile au molecule apolare, hidrofobe. Din punct de vedere structural, toate vitaminele liposolubile sunt derivaţi izoprenici. În organism, vitaminele liposolubile, provenite din alimentele ingerate, se comportă la fel cu grăsimile raţiei şi utilizarea lor depinde - în mare măsură - de metabolismul lipidelor. Astfel, pentru a fi absorbite din intestin vitaminele liposolubile necesită absorbţia normală a grăsimilor din hrană. După absorbţie, vitaminele liposolubile sunt transportate - prin chilomicroni - la ficat şi apoi depozitate; în ficat vitaminele A, D şi K iar în ţesutul adipos vitamina E.

Este de remarcat că, spre deosebire de vitaminele hidrosolubile, cele liposolubile sunt vehiculate prin sânge de către anumite lipoproteine (unite cu ele).

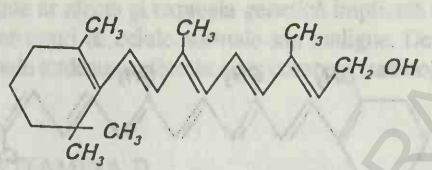
În organism vitaminele liposolubile împlinesc funcţii importante foarte diferite. Astfel, vitamina A este necesară - mai ales - în precesul vederii, vitamina D este direct implicată în metabolismul calciului şi fosforului, vitamina E joacă rol de antioxidant iar vitamina K este strict necesară în coagularea sângelui. Trebuie subliniat faptul că, potrivit noilor concepţii biochimice, actualmente vitamina D (colecalciferolul) nu se mai consideră vitamină propriuzisă ci pro-hormon.

III. 4.1. VITAMINA A (RETINOLUL)

Numele de vitamină A este generic, valabil pentru mai multe vitamere ale sale, având activitatea biologică a primului produs izolat căruia i se mai spune *retinol*. Acest nume se datorează faptului că este un alcool înrudit imediat cu retinalul care intră în constituţia bastonaşelor din retină (vezi, mai departe, rolul retinalului în menţinerea vederii). Actualmente există tendinţa de introducere a termenului de *retinoide* pentru cuprinderea într-un singur grup atât a vitaminelor A naturale cât şi a substanţelor sintetice, analoge retinolului.

Din punct de vedere chimic, vitamina A este un derivat poliizoprenoidic care conţine şi nucleul ciclohexenului:

Fig. III.29. - Vitamina A (retinolul)



Vitamina A are mai multe provitamine. Acestea sunt substanţe care se transformă - în organism - în vitamină. Provitaminele A sunt carotenii: α, β şi γ. Ei sunt pigmenţi de culoare galbenă - roz, aflaţi în anumite vegetale care fac parte din hrana obişnuită a omului. Carotenii sunt şi ei compuşi poliizoprenoidici şi cu nucleu ciclohexenic.

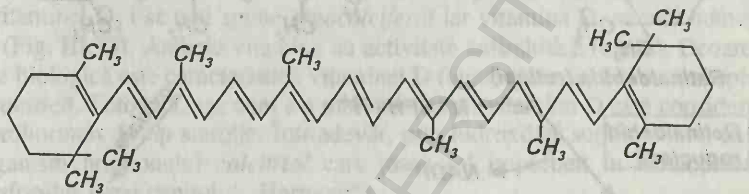


Fig. III.30. - β-carotenul

β - carotenul posedă o marcantă activitate antioxidantă faţă de radicalii liberi peroxidici. Deoarece activitatea sa antioxidantă interferă adesea cu cea a vitaminei E, potenţându-se reciproc, se presupune că aceşti compuşi liposolubili (provitamina A şi vitamina E) ar putea avea, împreună, şi o eficientă acţiune anticanceroasă.

Activitatea biologică a vitaminei A propriu zisă (retinolul) este împlinită, în parte, şi de alte două substanţe înrudite structural: retinalul şi acidul retinoic (Fig. III.31).

Retinalul (aldehidă) este un component al pigmentului vizual *rodopsina* din bastonaşele retinei. Într-adevăr, rodopsina este constituită dintr-o proteină simplă, *opsina* şi 11-cis-retinal (Fig. III.32).

Senzaţia vizuală, mediată de bastonaşe, ia naştere în urma absorbţiei fotonilor de lumină de către rodopsină. Însă absorbţia luminoasă determină descompunerea rodopsinei în opsină şi retinal cu structură *trans*. All-trans retinalul, generat de rodopsină, trece din nou în 11-cis-retinal prin izomerizare iar acesta din urmă reface rodopsina (Fig. III.32). Izomerizarea catalizată de o enzimă specifică, retinal izomeraza, este însă incompletă. Se înţelege, în aceste condiţii, că pentru asigurarea desfăşurării normale a procesului descris este absolut necesar un aport constant şi permanent în raţia alimentară de all-tras-retinal; respectiv, de vitamină A (all-trans-retinol).

Acidul retinoic participă la sinteza glicoproteinelor. De fapt, sub formă de retinil fosfat, acidul retinoic are rolul de a transporta, prin dublul strat lipidic celular, oligozaharidele care urmează să fie incorporate în glicoproteine. În acest proces acidul retinoic suferă şi el izomerizare enzimatică cis-trans, analogă celei întâlnite în ciclul rodopsinei.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

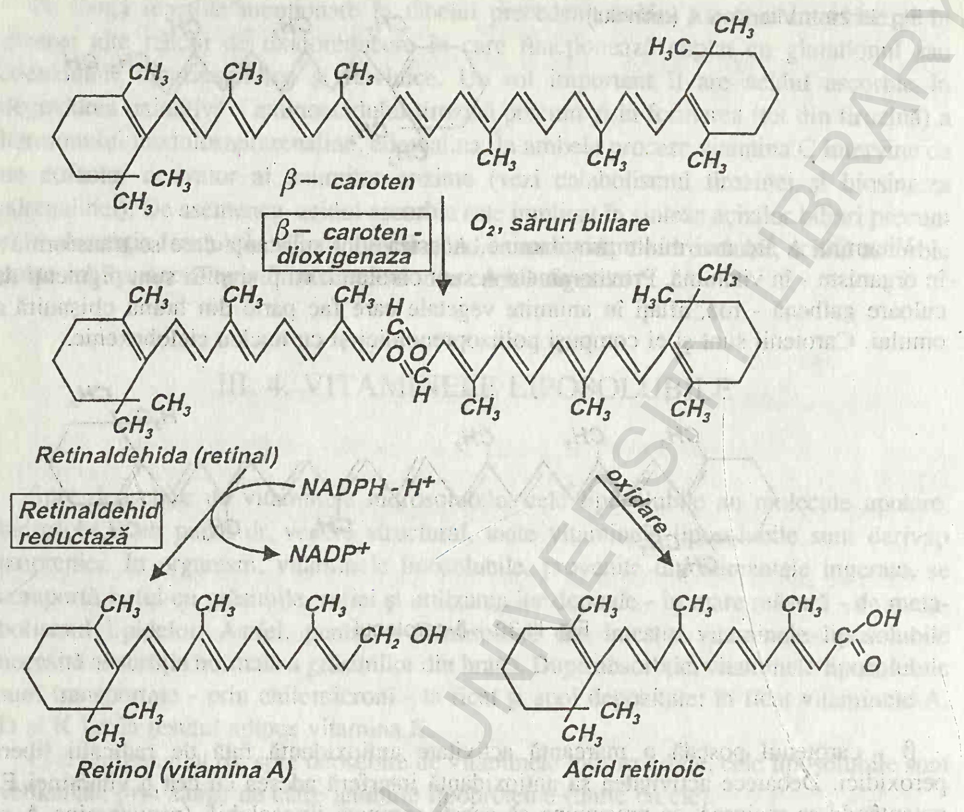


Fig. III.31. - Trecerea β-carotenului în retinol şi formarea derivaţilor înrudiţi

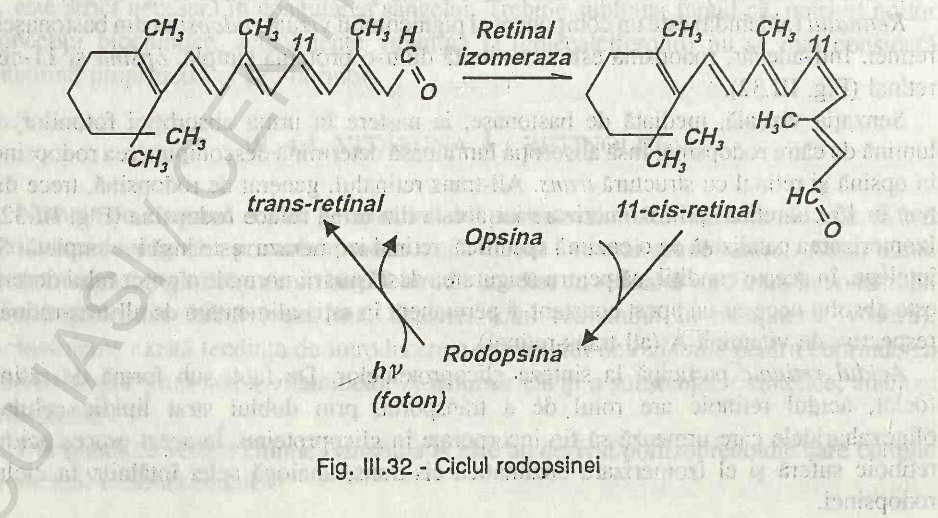


Fig. III.32 - Ciclul rodopsinei

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unele date relativ recente susţin că retinoidele ar afecta şi expresia genetică implicată atât în proliferarea cât şi în diferenţierea mai multor tipuri de celule normale sau maligne. De altfel, s-a constatat că administrarea de retinoide scade totdeauna efectele unor compuşi carcinogenici.

III. 4.2. VITAMINA D.

Ca şi vitamina A, vitamina D are mai multe vitamere şi mai multe provitamine D. Dintre ele, cele mai importante - din punct de vedere al acţiunii biologice şi al rolurilor metabolice pe care le îndeplinesc - sunt *vitaminele D_2* şi *D_3*. Ele corespund respectiv, provitaminelor *ergosterol* şi *7-dehidrocolesterol*. Tocmai pentru a se sublinia această provenienţă, vitaminei D_2 i se mai spune *ergocalciferol* iar vitamina D_3 se mai numeşte *colecalciferol* (Fig. III.33). Ambele vitamine au activitate antirahitică (egală). Deoarece această acţiune biologică este caracteristică vitaminei D (nume generic) ei i se mai spune *vitamina antirahitică*. Totodată, aşa cum s-a mai menţionat, vitamina D este considerată astăzi ca un prohormon de tip sterolic. Într-adevăr, prin hidroxilări suplimentare, ea dă naştere în organism hormonului *calcitriol* care joacă rol important în metabolismul calciului şi fosforului (vezi capitolul „Hormoni").

Din punct de vedere structural, provitaminele D sunt steroli care diferă între ei prin catena laterală fixată în poziţia 21 iar vitaminele corespunzătoare păstrează structura provitaminelor dar au nucleul B deschis.

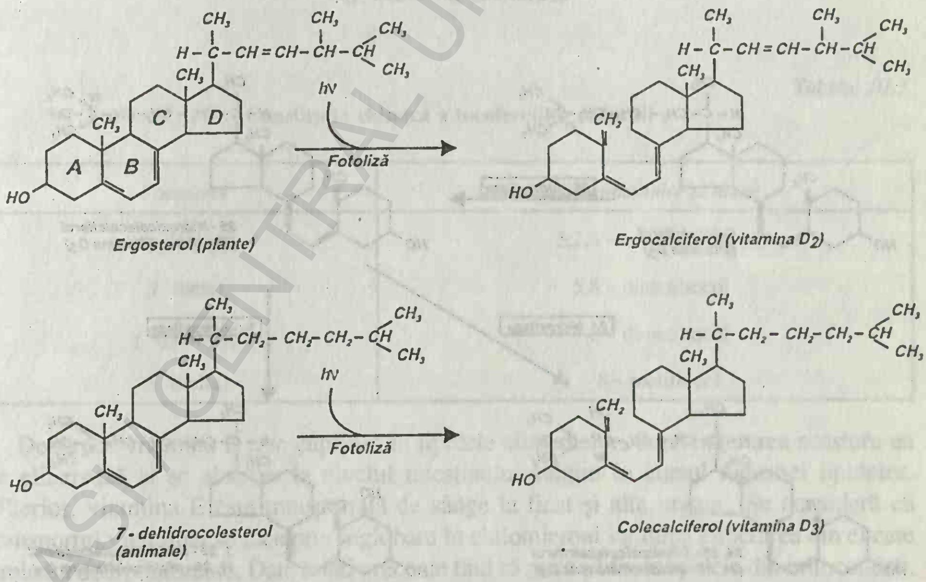


Fig. III.33. - Structurile ergosterolului, 7-dehidrocolesterolului şi ale vitaminelor D_2 şi D_3 rezultate prin fotoliză

Vitamina D din alimentele ingerate este supusă, ca şi grăsimile, acţiunii emulsifiante a bilei, apoi este absorbită prin regiunea proximală a intestinului subţire. De la acest nivel, transportul prin sânge al vitaminei D implică unirea sa cu o polipeptidă (sintetizată de ficat) şi care are mobilitate α - globulinică. În acest fel, vitamina D_2 (sau D_3) ajunge în ficat. Tot la ficat ajunge prin sânge şi vitamina D_3 formată din 7 - dehidrocolesterol - în piele - sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete din lumina solară.

În ficat vitamina D_3 suferă hidroxilare la poziţia 25 sub acţiunea unei enzime specifice (vitamina D_3-25-hidroxilaza). Produsul 25 - hidroxi - colecalciferolul (25 - hidroxi - vitamina D_3) reprezintă forma cea mai abundentă de compuşi din această categorie de vitamine D, aflată în circulaţia sangvină şi în depozitul hepatic. O fracţiune apreciabilă din ea suferă circuit enterohepatic ceea ce explică deficienţa de vitamină D resimţită în tulburările acestui proces. Ulterior, 25 - hidroxi - colecalciferolul din sânge suferă o nouă hidroxilare, la poziţia 1, sub acţiunea unei alte enzime specifice, 25 - hidroxi - vitamina D_3 - 1α - hidroxilaza, aflată în tubulii renali, oase şi placentă. Sub acţiunea unei alte enzime specifice aflată în tubulii renali, cartilagii şi placentă 25 - hidroxicolecalciferolul poate fi hidroxilat şi în poziţia 24. Nivelul acestui 24, 25 - dihidroxicolecalciferol în ser se află în relaţie reciprocă cu cel al 1,25 - dihidroxicolecalciferolului. Concentraţiile lor în sânge sunt egale când concentraţia calciului seric este normală. De fapt, reglarea nivelului lor în sânge se face direct de către hormonul paratiroidian şi indirect de concentraţia calciului seric.

Este de remarcat că nivelul 1,25 - dihidroxicolecalciferolului depinde - în mare măsură - şi de concentraţia fosforului plasmatic.

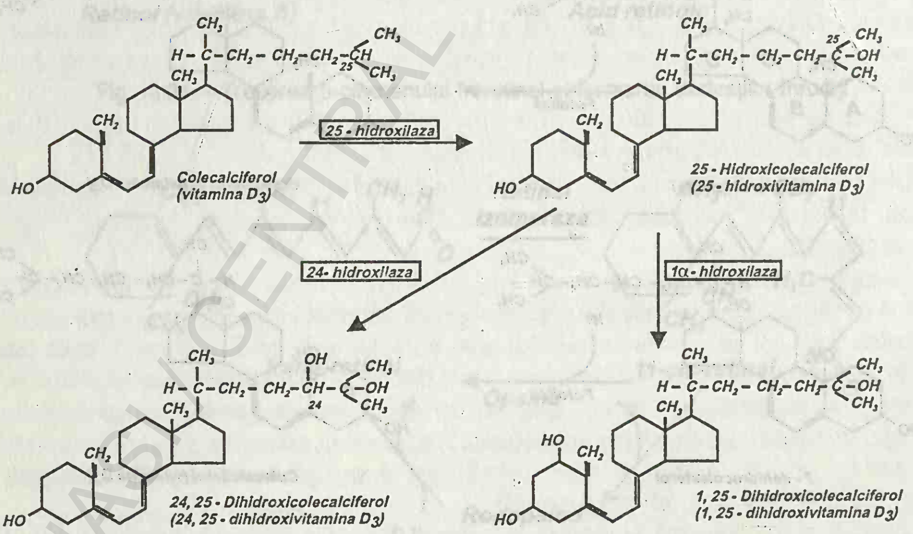


Fig. III.34. - Colecalciferolul şi produşii lui de hidroxilare formaţi în organism

III.4.3. VITAMINA E

Vitamina E se mai numeşte şi tocoferol. Acest nume este în legătură cu principala ei funcţie biologică de a favoriza fertilitatea (în greceşte tokos = naştere şi pherein = a purta, a suporta).

Vitamina E are 4 vitamere (tocoferoli) care se găsesc în natură, sunt semnificativi din punct de vedere dietar şi au constituţii chimice asemnănătoare (Fig. III.35, Tabel III.3.). Forma cea mai biologic - activă este α - tocoferolul.

Tocoferolii au în moleculele lor, ca structură de bază, tocolul. La rândul său, acesta conţine un nucleu cromanic substituit în poziţia 6 cu un hidroxil iar în poziţia 2 cu un metil şi un radical saturat conţinând 16 atomi de carbon. Din tocol derivă, prin metilări în diverse poziţii (5,7 sau 8) , cei patru tocoferoli naturali:

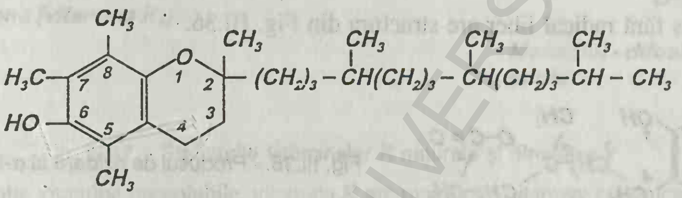


Fig. III.35. - α-tocoferolul

Tabelul III.3.

Constituţia chimică a tocoferolilor naturali

Tocoferol	*Poziţii substituite şi nume*
α (alpha)	5,7,8 - trimetiltocol
β (beta)	5,8 - dimetiltocol
γ (gamma)	7,8 - dimetiltocol
Δ (delta)	8 - metiltocol

Deoarece vitamina E este cuprinsă în lipidele alimentelor, după ingerarea acestora ea se eliberează şi se absorbe la nivelul intestinului subţire în cursul digestiei lipidelor. Ulterior, vitamina E este transportată de sânge la ficat şi alte organe. Se consideră că transportul vitaminei se face prin înglobare în chilomicroni iar după eliberarea din ei este preluată de lipoproteine. Date relativ recente tind să arate că fosfolipidele din mitocondrii, reticulul endoplasmatic şi membranele plasmatice posedă afinităţi deosebite (specifice) pentru α - tocoferol, ceea ce duce la concluzia că vitamina E se concentrează în aceste formaţiuni. De asemenea, după cum s-a mai menţionat, depozitarea tocoferolilor se face în ţesutul adipos.

BOOK CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În organismul uman vitamina E joacă un rol important, funcţionând ca antioxidant. În această calitate, ea protejează hematiile faţă de diverşi toxici oxidanţi (radicali liberi ai oxigenului), previne oxidarea unor hormoni hipofizari şi suprarenalieni precum şi oxidarea altor substanţe ce sunt utile ca atare; spre exemplu, vitamina A şi acizii graşi esenţiali.

Mecanismul intervenţiei tocoferolilor în procesul antioxidativ se explică în felul următor: tocoferolii pot întrerupe şirul reacţiilor (înlănţuite) ale radicalilor liberi datorită capacităţii lor de a transfera un hidrogen fenolic propriu la un radical liber *peroxi* dintr-un peroxid de acid gras polinesaturat:

$$\text{Toc OH} + \text{ROO}^{\cdot} \longrightarrow \text{Toc O}^{\cdot} + \text{ROOH}$$

Ulterior, radicalul liber fenoxi format din tocoferol reacţionează cu un alt peroxil liber:

$$\text{Toc O}^{\cdot} + \text{ROO}^{\cdot} \longrightarrow \text{ROOH + produs de oxidare fără radical liber}$$

Acest produs fără radical liber are structura din Fig. III.36.

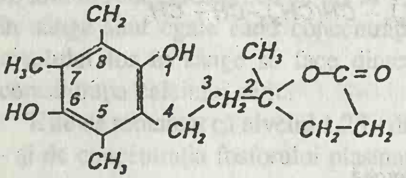


Fig. III.36. - Produsul de oxidare al α-tocoferolului

După conjugarea sa cu acidul glucuronic, produsul de oxidare al tocoferolului este excretat prin bilă - intestin.

Acţiunea antioxidantă a tocoferolilor este apreciabilă şi eficientă la concentraţii ridicate ale oxigenului. Datorită acestui fapt, tocoferolii au tendinţa să se concentreze în acele structuri lipidice care - în genere - sunt expuse la presiuni ridicate de oxigen; spre exemplu, în membrana eritrocitară şi în membranele arborelui respirator.

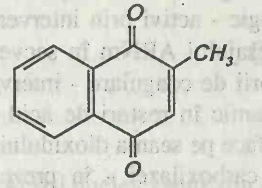
Un alt fapt demn de semnalat în legătură cu acţiunea antioxidantă a tocoferolului este conlucrarea sa cu seleniul în acelaş scop. Într-adevăr, în calitate de component al sistemului glutation peroxidazei - seleniu dependentă, seleniul participă şi el la prevenirea acţiunii distructive a peroxizilor, alături de vitamina E.

Pe de altă parte, aşa cum s-a specificat la vitamina A, tocoferolul poate fi întovărăşit în activitatea sa antioxidantă de β - caroten, cu acţiune sinergică de acelaş tip.

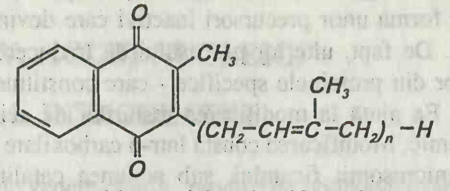
III.4.4. VITAMINA K

Vitamina *K* poartă acest indicator deoarece este necesară coagulării (Koagulation's Vitamin). Pentru acest motiv i se mai spune şi vitamina antihemoragică. Într-adevăr, carenţa vitaminei K determină predispoziţii la hemoragii datorate prelungirii timpului de coagulare a sângelui.

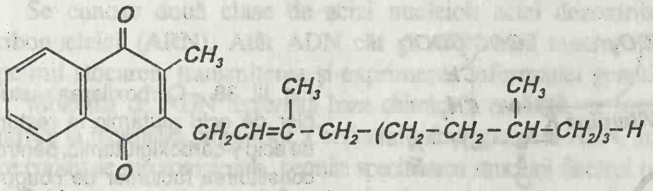
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



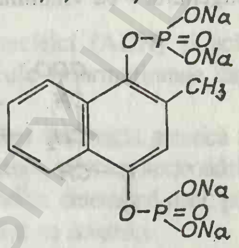
Menadiona (vitamina K_3)



Menachinona (vitamina K_2; n=6, 7, sau 9)



Filochinona (vitamina K_1)



Menadiol - difosfatul de sodiu

Fig. III.37. - Structurile vitaminelor K naturale şi de sinteză

Ca şi celelalte vitamine liposolubile, vitamina K are mai multe vitamere cu structuri chimice asemănătoare (Fig. 37). În primul rând, există două vitamine K naturale importante; vitamina K_1, izolată din vegetale şi vitamina K_2, izolată din ţesuturi animale şi bacterii intestinale (care au capacitatea de a o sintetiza). De asemenea, *ftiocolul*, constituent al membranelor lipidice din bacilul Koch, are şi el activitate de vitamină K. Alături de acestea, există mai mulţi produşi de sinteză folosiţi în terapeutică şi care au constituţii chimice asemănătoare iar activităţi de vitamină K cel puţin egale cu cele ale produşilor naturali. În această categorie intră *menadiona* şi unii derivaţi funcţionali ai săi (Fig.37).

În constituţia lor moleculară, vitaminele K naturale cuprind nucleul p - naftochinonei substituit în poziţia 2 cu un radical metil iar în poziţia 3 cu un radical poliizoprenoidic. Produşii de sinteză nu conţin în moleculele lor radicali poliizoprenoidici.

Vitamina K din alimentele ingerate este absorbită la nivelul jejunului şi acest proces depinde de absorbţia normală a lipidelor. Într-adevăr, cea mai frecventă deficienţă de vitamină K se datorează malabsorbţiei grăsimilor care - la rândul ei - este asociată cu disfuncţia pancreatică, obstrucţii biliare, atrofierea mucoasei intestinale sau altor diverse cauze de steatoree. După absorbţie, sub acţiunea bilei, vitaminele K naturale - împreună cu lipidele - trec pe cale limfatică în sânge care le duce la ficat. Vitaminele K de sinteză trec direct în torentul sangvin (fiind hidrosolubile). Ficatul este principalul organ de depozitare temporară a vitaminelor K naturale. Vitaminele K de sinteză nu se acumulează în ficat; excesul lor se elimină prin urină, sub formă de glucurono-conjugaţi.

Cea mai importantă funcţie a vitaminei K în organism este implicarea ei în procesul coagulării. După cum se ştie, la formarea fibrinei participă protrombina iar la biosinteza protrombinei intervine vitamina K. Cercetări relativ recente au demonstrat că această vitamină nu este implicată numai în biosinteza protrombinei (factorul II) dar şi în cea a altor factori de coagulare (VII, IX, X). Toţi aceşti factori ai coagulării sunt biosintetizaţi

altor factori de coagulare (VII, IX, X). Toţi aceşti factori ai coagulării sunt biosintetizaţi în ficat, sub forma unor precursori inactivi care devin biologic - activi prin intervenţia vitaminei K. De fapt, ulterior procesului de traducere a mesajului ARNm în secvenţa aminoacizilor din proteinele specifice - care constituie factorii de coagulare - intervine vitamina K. Ea ajută la modificarea resturilor de acid glutamic în resturi de acid γ - carboxiglutamic. Modificarea constă într-o carboxilare ce se face pe seama dioxidului de carbon, în microsomii ficatului, sub acţiunea catalitică a carboxilazei - în prezenţa oxigenului - cu vitamina K (forma hidrochinonică) drept cofactor al enzimei.

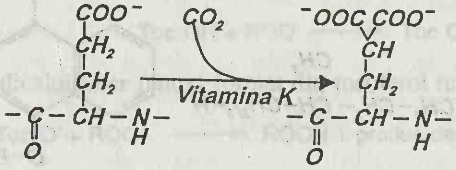


Fig. III. 38. - Carboxilarea resturilor de acid glutamic la resturi de acid γ-carboxiglutamic, pentru constituirea factorilor de coagulare, prin intervenţia vitaminei K

Resturile de acid γ - carboxiglutamic (protrombina conţine 10 asemenea resturi) pot chela ionul calciu:

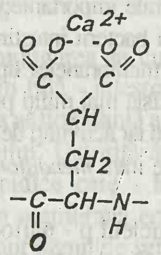


Fig. III.39. - Chelarea ionului de calciu de către acidul γ-carboxiglutamic

Acest proces de fixare a calciului este esenţial pentru rolul biologic al factorilor de coagulare.

S-a constatat că pe lângă factorii de coagulare există şi alte proteine care conţin resturi de acid γ - carboxiglutamic, formate tot prin intervenţia vitaminei K. Aceste proteine au fost identificate în diverse organe: plămâni, splină, rinichi, placentă, oase (osteocalcina).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap.IV. ACIZII NUCLEICI

IV.1. INTRODUCERE

Acizii nucleici sunt, din punct de vedere chimic, produşi de policondensare a unor unităţi denumite nucleotide.

Se cunosc două clase de acizi nucleici: acizi dezoxiribonucleici (ADN) şi acizi ribonucleici (ARN). Atât ADN cât şi ARN sunt macromolecule informaţionale care permit stocarea, transmiterea şi exprimarea informaţiei genetice.

Molecula de ADN reprezintă baza chimică a eredităţii, ea conţinând informaţia genetică cu privire la biosinteza proteinelor. Conţinutul informaţional al ADN, înscris în secvenţa nucleotidelor ce constituie macromolecula, permite specificarea structurii fiecărei proteine, determină deci, prin definirea caracterelor morfofuncţionale ale unui organism, individualitatea acestuia.

Transmiterea informaţiei genetice de-a lungul generaţiilor, cu o fidelitate ireproşabilă, este rezultatul capacităţii de autoreplicare a moleculei ADN în virtutea căreia molecula de ADN parental este copiată astfel încât să formeze două molecule - fiice având o secvenţă nucleotidică, deci un conţinut informaţional, identică cu ADN parental.

Exprimarea informaţiei genetice cuprinsă în molecula de ADN în secvenţe specifice de aminoacizi, deci în proteine, se realizează pe parcursul a două procese:

- transcrierea - constând în rescrierea unor părţi din mesajul genetic sub forma unui ARN denumit mesager. Acesta preia din nucleu mesajul genetic cu privire la biosinteza unei anumite proteine şi-l aduce în citoplasmă, locul de biosinteză a proteinelor;
- traducerea - în cursul căreia mesajul genetic, care se află înscris într-o succesiune de triplete (grup de trei nucleotide) din ARNm este exprimat în secvenţă de aminoacizi. Fiecăruia dintre cei 20 de aminoacizi îi corespunde o succesiune de trei nucleotide, desemnată drept codon. Amplasarea aminoacizilor într-o secvenţă caracteristică unei proteine (codificată de un anumit fragment ADN şi transcrisă într-un anumit ARN_m) este asigurată de molecule de ARN „de transfer“, purtătoare ale unor triplete complementare cu diverşi codoni din structura ARN_m denumiţi anticodoni. Acest ARN de transfer „adaptează“ un anumit aminoacid, cel pe care-l transportă, în faţa codonului de pe ARNm ce specifică aminoacidul dat, graţie recunoaşterii codon-anticodon. În felul acesta, fiecare aminoacid îşi găseşte locul „consacrat“ în polipeptidul în curs de sinteză.

Fluxul de informaţie în lumea vie este exprimat prin „dogma centrală“ a geneticii moleculare, care redă relaţia celor trei procese fundamentale (replicare, transcriere, traducere) graţie cărora se asigură continuitatea genetică a organismelor:

Replicare ⟲ ADN —Transcriere→ ARN_m —Traducere→ PROTEINE.

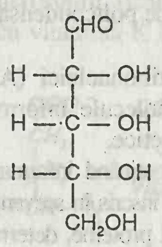
Descoperiri relativ recente completează substanţial imaginea oferită de „dogma centrală“, ţinându-se seama de capacitatea de autoreplicare a unor tipuri de ARN ca şi de cea de transcriere a informaţiei din ARN în ADN.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

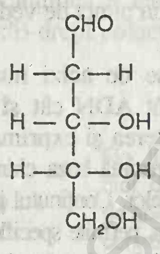
IV.2. STRUCTURA CHIMICĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Hidroliza acidă a acizilor nucleici dă naştere la baze azotate, pentoze şi acid fosforic.

Pentoza din structura acizilor ribonucleici s-a dovedit a fi D-riboza, în timp ce aceea din structura ADN este D-dezoxiriboza. În structura acizilor nucleici pentozele se găsesc sub formă ciclică, β-furanozică.



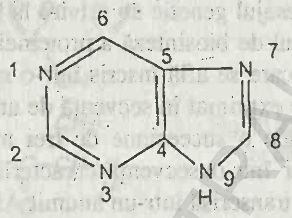
D-riboza



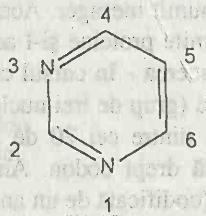
D-2-dezoxiriboza

IV.2.1. BAZELE AZOTATE DIN STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI.

Bazele azotate care intră în structura acizilor nucleici derivă din două structuri heterociclice: purina şi pirimidina.



Purina

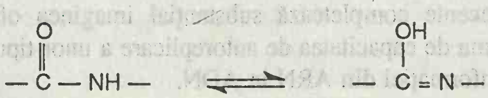


Pirimidina

Bazele purinice din structura acizilor nucleici sunt adenina (6-amino-purina) şi guanina (2-amino-6-hidroxipurina).

Ca baze pirimidinice s-au identificat 3 baze majore:
- uracilul (2,4-dihidroxi-pirimidina);
- timina (2,4-dihidroxi-5-metil-pirimidina);
- citozina (2-hidroxi-4-amino-pirimidina).

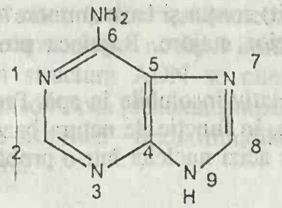
Bazele purinice şi pirimidinice prezintă fenomenul de tautomerie. Se consideră structuri tautomere două structuri care diferă una de cealaltă prin poziţia unui atom de hidrogen şi a unei duble legături. Bazele azotate prezintă tautomerie lactim-lactam datorită grupei —C(OH) = N— care există în echilibru cu forma —C(=O)—NH—



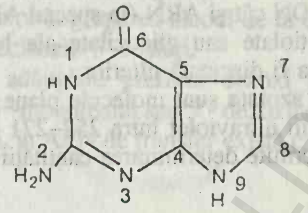
forma lactam ⇌ forma lactim

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

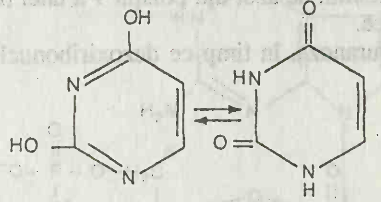
În structura acizilor nucleici se găsesc formele lactam, mai stabile.



Adenina
(6-aminopurina)

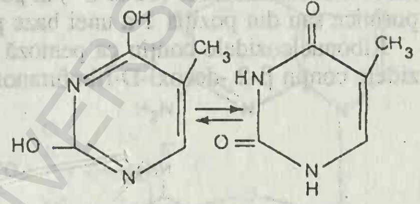


Guanina
(2-amino-6-hidroxipurina)
Lactam



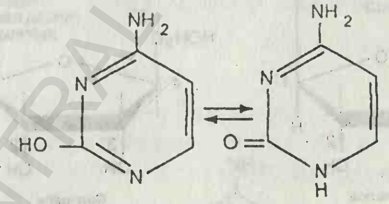
Lactim Lactam

Uracil
(2,4-dihidroxi-pirimidina)



Lactim Lactam

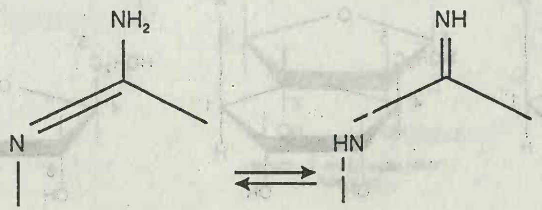
Timina
(5-metil-uracil)



Lactim Lactam

Citozina
(2-hidroxi-4-amino-pirimidina)

Derivaţii aminaţi care nu conţin grupări –OH prezintă şi ei tautomerie imino-amino, dar echilibrul este net deplasat în favoarea formei amino:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ca atare, adenina se va prezenta sub forma amino.

De menţionat că uracilul este baza pirimidinică specifică ARN, în timp ce timina este baza pirimidinică specifică ADN.

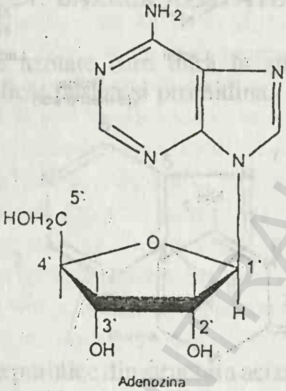
Atât ADN cât şi ARN (în special ARNt) conţin şi baze „minore“ ce reprezintă forme metilate, tiolate sau glicozilate ale bazelor majore. Raţiunea prezenţei lor în acizii nucleici va fi discutată ulterior.

Bazele azotate sunt molecule plane, relativ insolubile în apă. Prezintă un maxim de absorbţie în ultraviolet între 252–271 nm, în funcţie de natura bazei azotate şi de pH, ceea ce permite determinarea cantităţii de acizi nucleici într-o probă.

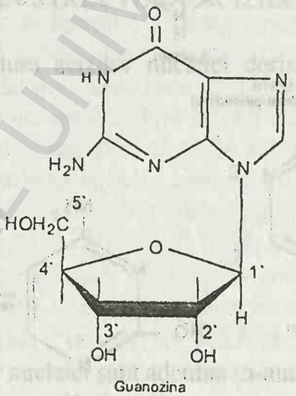
IV.2.2. NUCLEOZIDE ŞI NUCLEOTIDE DIN STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI

Nucleozidele sunt compuşi ce rezultă prin stabilirea unei legături N-glicozidice între hidroxilul semiacetalic (de la C ') al pentozei şi atomul de azot din poziţia 9 a unei baze purinice sau din poziţia 1 a unei baze pirimidinice.

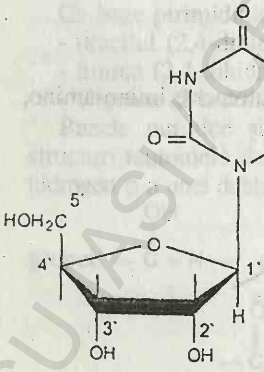
Ribonucleozidele conţin ca pentoză β-D-ribofuranoza, în timp ce dezoxiribonucleozidele conţin β-2 -dezoxi-D-ribofuranoza.



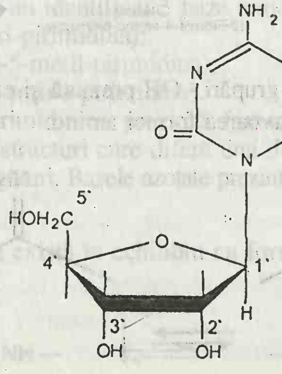
Adenozina



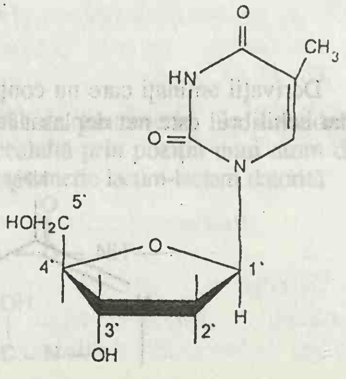
Guanozina



Uridina



Citidina



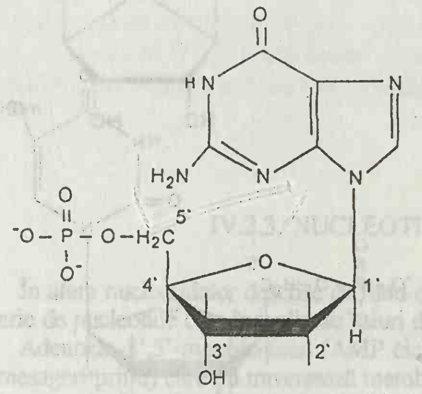
Dezoxitimidina

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

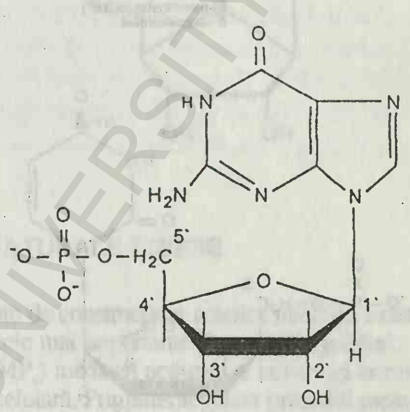
Dezoxiribonucleozidele se citesc adăugând prefixul dezoxi la numele ribonucleozidului corespunzător. În unele nucleozide pirimidinice, denumite pseudonucleozide, legătura între pentoză şi baza azotată se realizează prin intermediul C_5 şi N_1.

Nucleotidele sunt esteri fosforici ai nucleozidelor la gruparea alcool de la $C_{5'}$, sau $C_{3'}$ al pentozei. În structura acizilor nucleici intră nucleozid-5'-fosfaţi.

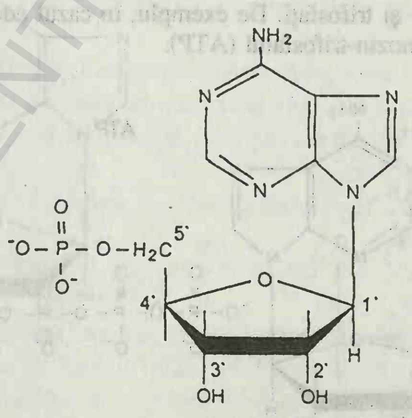
Nucleotidele din structura ADN se citesc adăugând prefixul dezoxi la numele nucleotidului conţinând riboza (dezoxiadenozin-5'-monofosfat sau 5'- dezoxiadenilat): În timp ce ADN îi este propriu 5'- dezoxitimidilatul, în ARN de transfer există ca nucleotid „minor“ 5'-timidilatul.



Dezoxiguanozin-5'-monofosfat (dGMP)
(5'-Dezoxiguanilat)

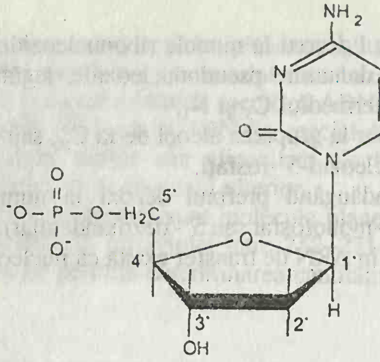


Guanozin-5'-monofosfat (GMP)
(5'-Guanilat)

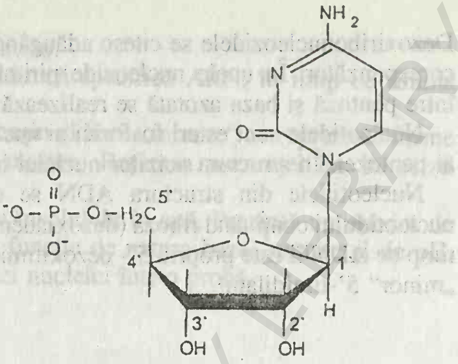


Adenozin-5'-monofosfat (AMP)
(5'-Adenilat)

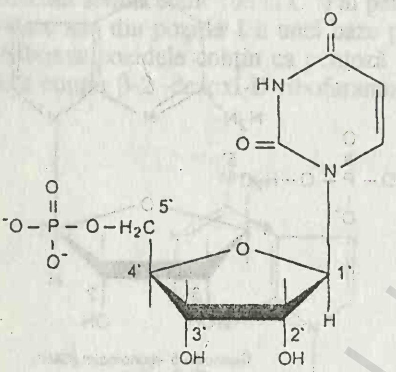
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



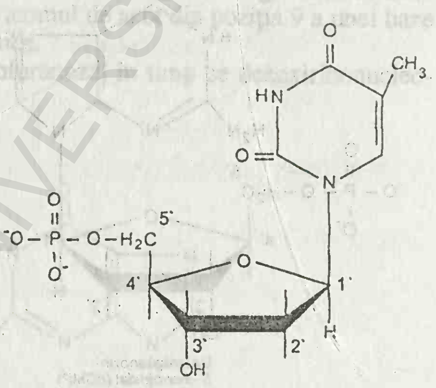
Dezoxicitidin
5'-monofosfat (dCMP)
5'-dezoxicitidilat



Citidin-5'-monofosfat (CMP)
(5'-citidilat)



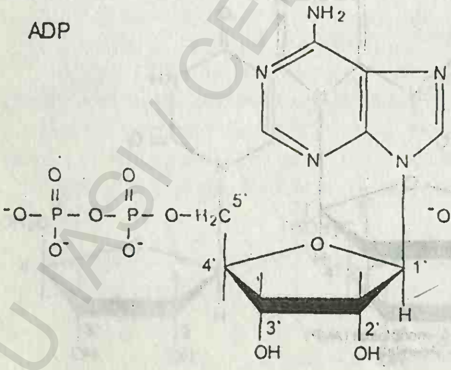
Uridin-5'-monofosfat (UMP)
(5'-uridilat)



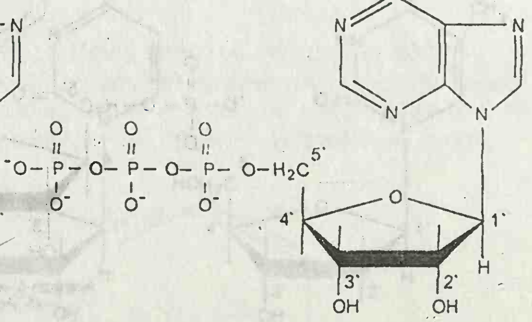
Dezoxitimidin
5'-monofosfat (dTMP)
(5'-dezoxitimidilat)

Dacă un nucleozid sau un dezoxinucleozid este di- sau trifosforilat se obţin nucleozid sau dezoxinucleozid di- şi trifosfaţi. De exemplu, în cazul adeninei se obţin adenozin-difosfatul (ADP) şi adenozin-trifosfatul (ATP).

ADP

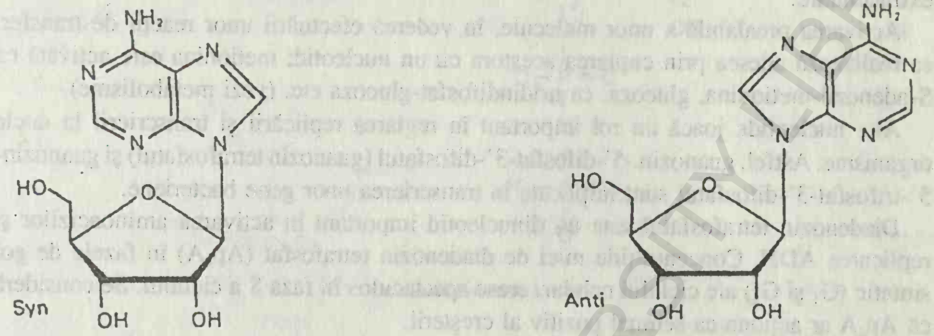


ATP



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

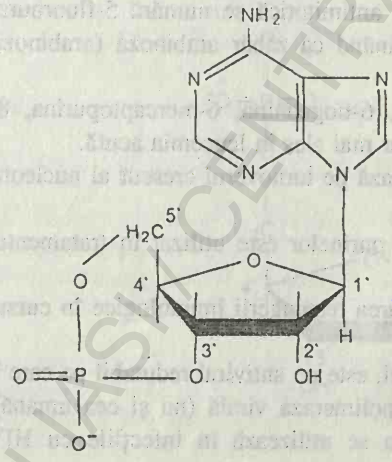
De menţionat existenţa a două conformaţii posibile pentru nucleozide şi nucleotide derivând din suprimarea rotaţiei libere în jurul legăturii β-N-glicozidice: conformaţia anti şi conformaţia syn. În conformerii anti, dezoxiriboza şi baza sunt situate de părţi opuse faţă de legătura glicozidică, ceea ce reduce repulsia sterică între acestea. Uzual, conformerii anti sunt prezenţi în dubla helice Watson-Crick (ADN-forma B) în timp ce conformerii syn sunt prezenţi în ADN-forma Z (vezi structura ADN).



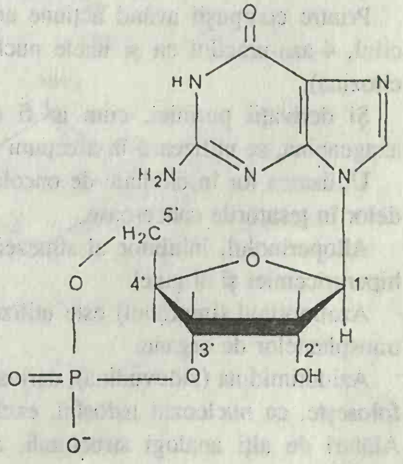
IV.2.3. NUCLEOTIDE NATURALE LIBERE

În afara nucleotidelor descrise ca fiind elemente de construcţie a acizilor nucleici, există o serie de nucleotide care îndeplinesc roluri dintre cele mai importante şi variate în ţesuturi.

Adenozin-3',5'-monofosfatul (AMP ciclic, AMP_c) mediază acţiunea a numeroşi hormoni (mesageri primi) care nu traversează membrana celulară. Prin interacţiunea primului mesager (hormonul) cu enzima membranară adenilat ciclaza pe care o activează, ia naştere din ATP



Structura 3',5' AMP(AMPc)



Structura 3',5' GMP (GMPc)

adenozin monofosfatul ciclic (mesagerul secund). AMP_c este interpretul acţiunii hormonilor respectivi în celulă, el realizând, prin intermediul unor kinaze, fosforilarea reversibilă a unor enzime, activarea sau inactivarea acestora (vezi hormoni). Suprimarea acţiunii hormonului se traduce prin hidroliza AMP_c sub acţiunea fosfodiesterazei.

Ca şi AMP_c, şi GMP_c se comportă ca un important semnal intracelular al unor mesaje extracelulare.

Activarea prealabilă a unor molecule, în vederea efectuării unor reacţii de transfer, se realizează adesea prin cuplarea acestora cu un nucleotid; metionina este activată ca S-adenozil-metionina, glucoza, ca uridindifosfat-glucoza etc. (vezi metabolisme).

Alte nucleotide joacă un rol important în reglarea replicării şi transcrierii la unele organisme. Astfel, guanozin-5'-difosfat-3'-difosfatul (guanozin tetrafosfatul) şi guanozin-5'-trifosfat-3'-difosfatul sunt implicate în transcrierea unor gene bacteriene.

Diadenozin tetrafosfatul este un dinucleotid important în activarea aminoacizilor şi replicarea ADN. Concentraţiile mici de diadenozin tetrafosfat (Ap_4A) în fazele de gol sintetic (G_1 şi G_2) ale ciclului celular, cresc spectaculos în faza S a ciclului. Se consideră că Ap_4A ar acţiona ca semnal pozitiv al creşterii.

IV.2.4. ANALOGI STRUCTURALI AI BAZELOR AZOTATE ŞI NUCLEOZIDELOR

Analogii structurali ai bazelor purinice şi pirimidinice sau ai nucleozidelor se comportă ca antimetaboliţi, ei putând să acţioneze fie prin incorporare în acizii nucleici, fie prin inhibarea unor enzime implicate în biosinteza ADN.

Printre compuşii având acţiune antivirală sau antimitotică se numără 5-fluorouracilul, 4-aza-uracilul ca şi unele nucleozide conţinând ca zahăr arabinoza (arabinozil citozina).

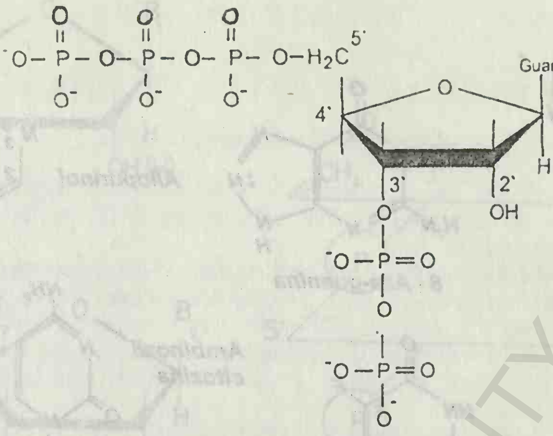
Şi derivaţii purinici, cum ar fi 6-tioadenina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, 8-azaguanina, se utilizează în afecţiuni tumorale, dar mai ales în leucemia acută.

Utilizarea lor în clinicile de oncologie se bazează pe turnoverul crescut al nucleotidelor în ţesuturile canceroase.

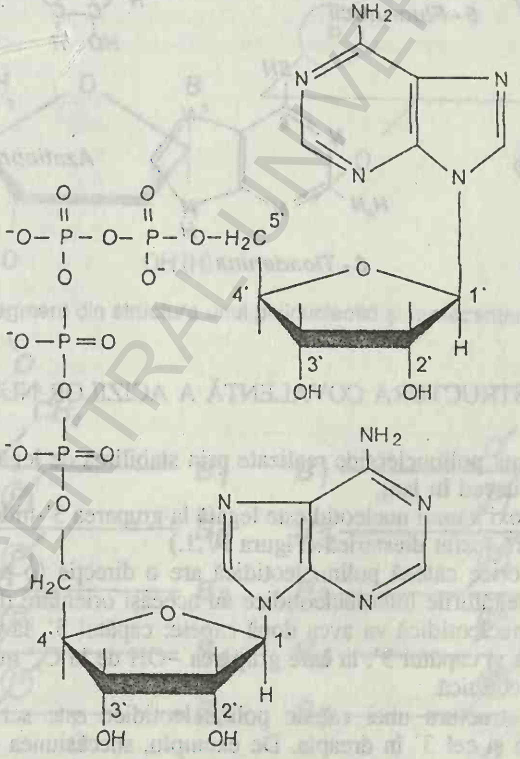
Allopurinolul, inhibitor al sintezei de novo a purinelor este utilizat în tratamentul hiperuricemiei şi al gutei.

Azatioprinul (imuranul) este utilizat în prevenirea respingerii imunologice în cursul transplantelor de organe.

Azidotimidina (zidovudina), derivat al timidinei, este un antiviral redutabil pe care îl foloseşte, ca nucleozid trifosfat, exclusiv ADN polimeraza virală (nu şi cea umană). Alături de alţi analogi structurali, azidotimidina se utilizează în infecţiile cu HIV (virusul imunodeficienţei umane).

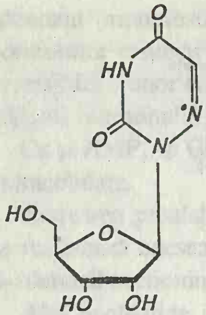


Guanozin-5'-trifosfat-3'-difosfat

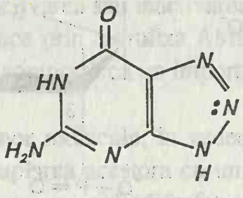


Ap_4A

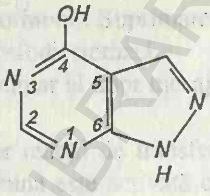
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



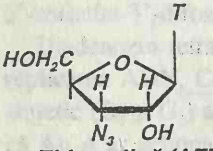
6- Aza-uridina



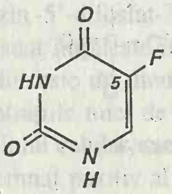
8 - Aza-guanina



Allopurinol

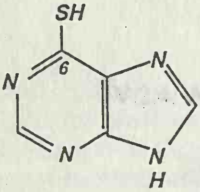


Zidovudină (AZT)

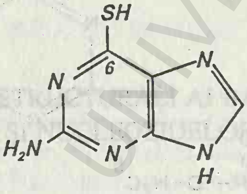


5 - Fluoruracil

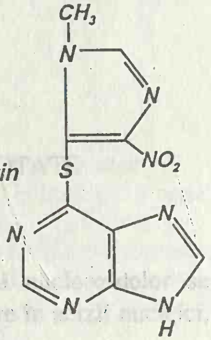
Arabinozil citozina



6 - Mercaptopurina



6 - Tioadenina



Azatioprin

IV.5.2. STRUCTURA COVALENTĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Acizii nucleici sunt polinucleotide realizate prin stabilirea de legături covalente între nucleotidele ce se succed în lanţ.

Gruparea 5'-hidroxi a unui nucleotid este legată la gruparea 3'-hidroxi a nucleotidului următor prin legătură fosfat diesterică (Figura IV.1.)

De remarcat că orice catenă polinucleotidică are o direcţie (o polaritate) specifică, în sensul că, toate legăturile internucleotidice au aceeaşi orientare de-a lungul lanţului. Fiecare catenă polinucleotidică va avea două capete: capătul 5', la care gruparea –OH de la C_5' este liberă, şi capătul 3', la care gruparea –OH de la C_3' nu este angajată într-o legătură internucleotidică.

Prin convenţie, structura unei catene polinucleotidice este scrisă întotdeauna cu capătul 5' în stânga şi cel 3' în dreapta. De exemplu, succesiunea ACGAC semnifică faptul că adenina are grupa 5'–OH neangajată în legătura cu alt nucleotid în timp ce citozina are liberă gruparea 3'–OH. Două lanţuri polinucleotidice sunt antiparalele atunci când unul evoluează în direcţia 5'→3', iar celălalt în direcţia 3'→5' (Figura IV.2).

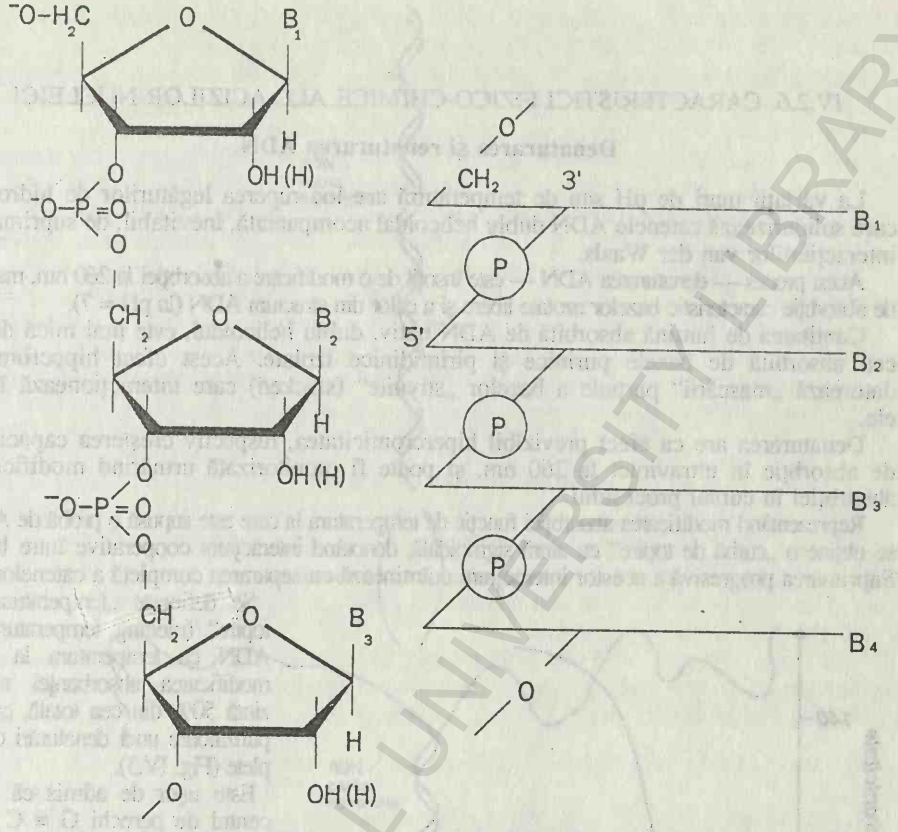


Fig. IV.1 - Fragment din structura unui polinucleotid şi reprezentarea sa schematică

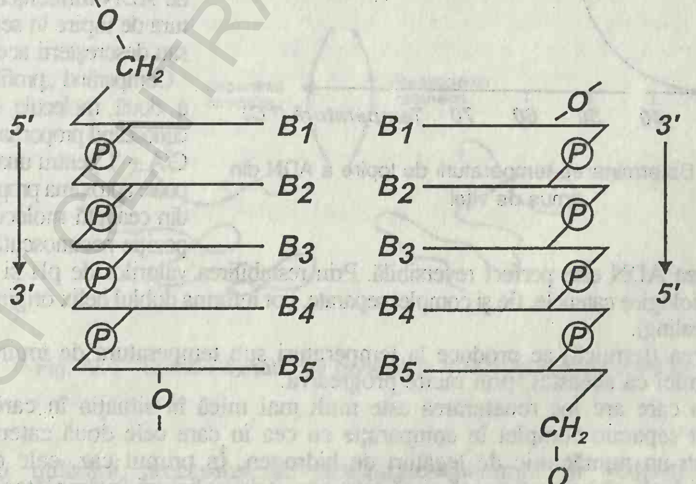


Fig. IV.2 - Catene polinucleotidice antiparalele; reprezentare schematică

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.2.6. CARACTERISTICI FIZICO-CHIMICE ALE ACIZILOR NUCLEICI

Denaturarea şi renaturarea ADN

La variaţii mari de pH sau de temperatură are loc ruperea legăturilor de hidrogen care solidarizează catenele ADN dublu helicoidal acompaniată, inevitabil, de suprimarea interacţiunilor van der Waals.

Acest proces — denaturarea ADN — este însoţit de o modificare a absorbţiei la 260 nm, maxim de absorbţie caracteristic bazelor azotate libere şi a celor din structura ADN (la pH = 7).

Cantitatea de lumină absorbită de ADN nativ, dublu helicoidal, este mai mică decât cea absorbită de bazele purinice şi pirimidinice izolate. Acest efect hipocrom se datorează „mascării" parţiale a bazelor „stivuite" (stacked) care interacţionează între ele.

Denaturarea are ca efect previzibil hipercromicitatea, respectiv creşterea capacităţii de absorbţie în ultraviolet la 260 nm, şi poate fi monitorizată urmărind modificarea absorbţiei în cursul procesului.

Reprezentând modificarea absorbţiei funcţie de temperatura la care este supusă o probă de ADN se obţine o „curbă de topire" cu alură sigmoidală, denotând interacţiuni cooperative între baze. Suprimarea progresivă a acestor interacţiuni culminează cu separarea completă a catenelor.

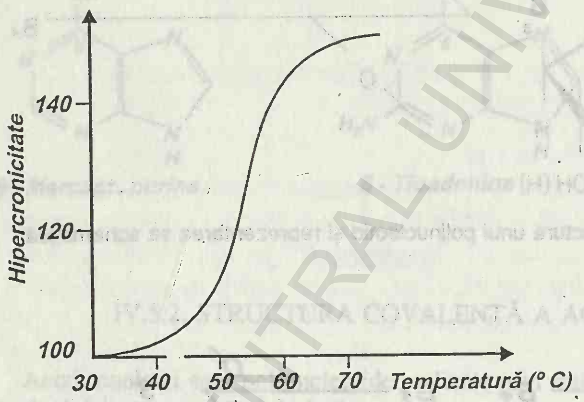


Fig. IV.3 - Determinarea temperaturii de topire a ADN din timus de viţel

Se defineşte „temperatura de topire" (melting temperature) a ADN ca temperatura la care modificarea absorbanţei reprezintă 50% din cea totală, corespunzătoare unei denaturări complete (Fig. IV.3).

Este uşor de admis că procentul de perechi G ≡ C respectiv A = T dintr-o moleculă de ADN influenţează temperatura de topire în sensul creşterii sau descreşterii acesteia.

Comparând „profilul" de topire a două molecule de ADN şi cunoscând proporţia de baze G + C/A + T pentru una dintre ele se poate aproxima proporţia acestora din cealaltă moleculă, cu compoziţie necunoscută.

Denaturarea ADN este perfect reversibilă. Prin restabilirea valorilor de pH şi temperatură la valori fiziologice catenele, fie şi complet separate, pot reforma dublul helix originar prin renaturare (annealing).

Renaturarea (termică) se produce la temperaturi sub temperatura de topire (ideal, cu 20°C mai mici ca aceasta), prin răcire progresivă.

Viteza cu care are loc renaturarea este mult mai mică în situaţia în care cele două catene sunt separate complet în comparaţie cu cea în care cele două catene au rămas legate printr-un număr mic de legături de hidrogen. În primul caz, cele două catene trebuie mai întâi să se regăsească şi să tatoneze, prin coliziuni întâmplătoare, alinierea corectă pe o porţiune mică care apoi se va extinde. În cel de-al doilea caz există deja un reper care va permite o renaturare spontană (Fig. IV.4).

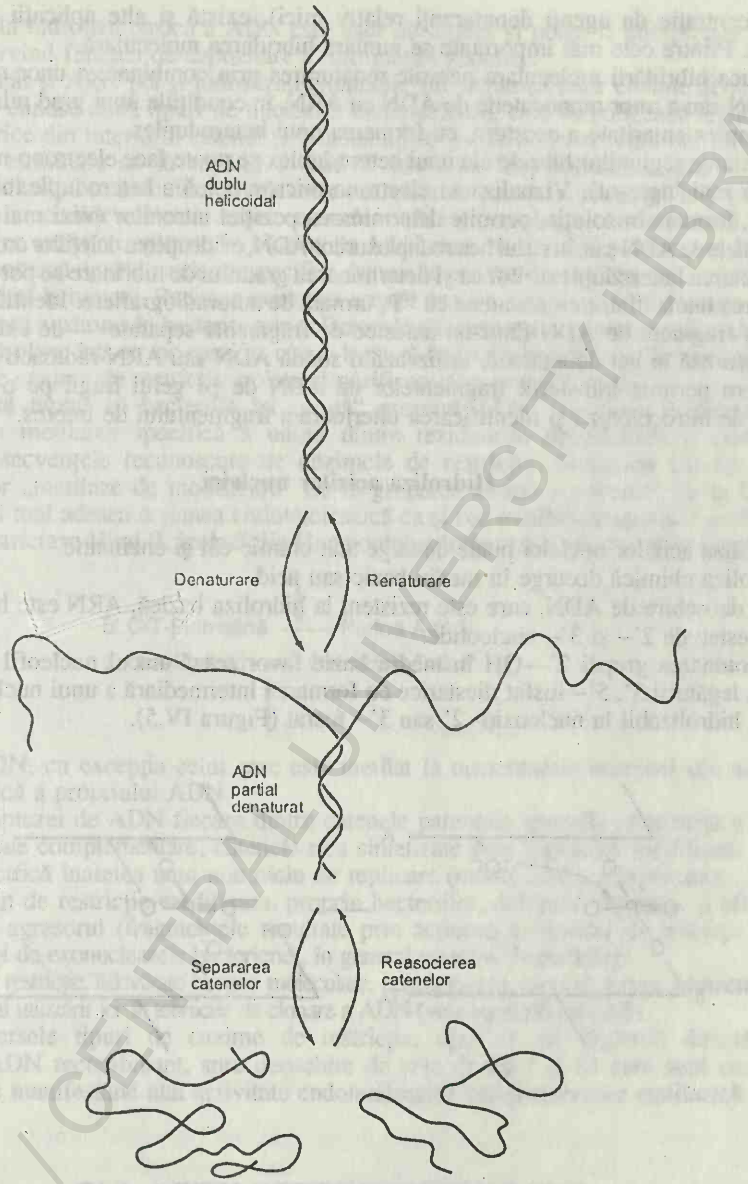


Fig. IV.4 - Stadiile denaturării reversibile a ADN şi regenerarea sa

În afara utilizării procesului de denaturare-renaturare în vederea determinării proporţiilor de baze dintr-o moleculă de ADN ca şi a hărţilor de denaturare (localizarea regiunilor bogate în perechi A=T în condiţiile unei denaturări „blânde" — temperatură

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şi concentraţie de agenţi denaturanţi relativ mici), există şi alte aplicaţii ale acestui proces. Printre cele mai importante se numără hibridarea moleculară.

Tehnica hibridării moleculare permite renaturarea prin combinare a unor monocatene de ADN sau a unor monocatene de ADN cu ARN, în condiţiile unui grad relativ crescut de complementaritate a acestora, cu formarea unui heteroduplex.

Detectarea regiunilor hibride ale unui heteroduplex se poate face electrono-microscopic (contur mai îngroşat). Vizualizarea electrono-microscopică a heteroduplexurilor ADN-ARN_m, formate în soluţie, permite determinarea poziţiei intronilor (vezi mai departe) în moleculele de ADN sau, în cazul heteroduplexurilor ADN, evidenţierea deleţiilor cromozomiale.

Detectarea heteroduplexurilor ca şi determinarea gradului de hibridare se pot face şi prin marcarea uneia dintre monocatene cu ^{32}P, urmată de autoradiografiere. Identificarea unui anumit fragment de ADN dintr-un amestec de fragmente separate — de exemplu, prin electroforeză în gel de agaroză, utilizează o sondă ADN sau ARN radioactivă. Tehnica Southern permite transferul fragmentelor de ADN de pe gelul fragil pe o membrană solidă de nitroceluloză şi identificarea ulterioară a fragmentului de interes.

Hidroliza acizilor nucleici

Hidroliza acizilor nucleici poate decurge atât chimic cât şi enzimatic.

Hidroliza chimică decurge în mediu bazic sau acid.

Spre deosebire de ADN, care este rezistent la hidroliza bazică, ARN este hidrolizat la un amestec de 2'– şi 3'– nucleotide.

Deprotonarea grupei 2'—OH în mediu bazic favorizează atacul nucleofil al acesteia asupra legăturii 3', 5'– fosfat diesterice cu formarea intermediară a unui nucleotid ciclic 2', 3', hidrolizabil la nucleozid-2' sau 3'– fosfat (Figura IV.5).

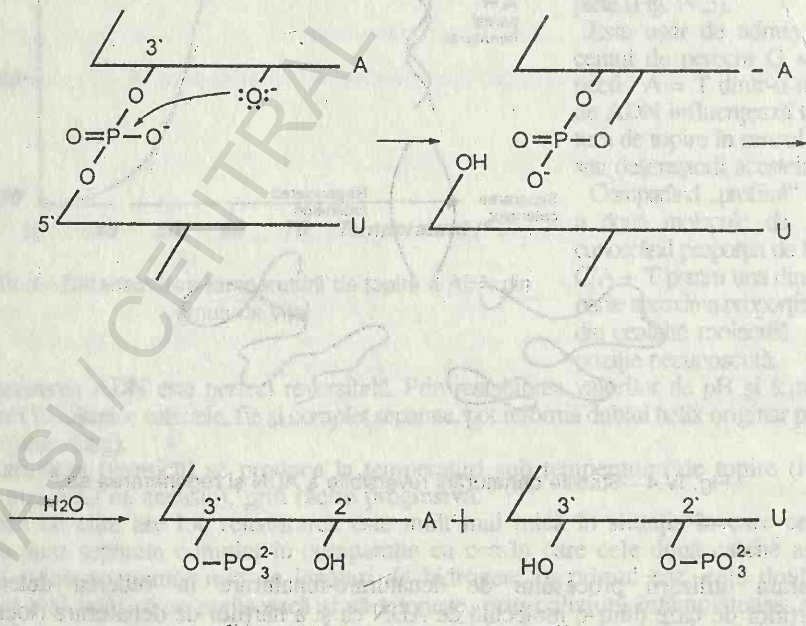


Fig. IV.5 — Hidroliza bazică a ARN

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezistenţa la hidroliza bazică a ADN este uşor de înţeles şi poate fi interpretată ca o necesitate servind funcţiei de depozitare a informaţiei genetice.

Atât ADN cât şi ARN pot fi hidrolizaţi enzimatic sub acţiunea unor enzime denumite nucleaze. Se cunosc două tipuri de nucleaze: endonucleaze, care hidrolizează legăturile fosfat diesterice din interiorul catenei polinucleotidice şi exonucleaze, care hidrolizează nucleotidele terminale de la capătul 5' sau 3' ale unui lanţ polinucleotidic. Aceste enzime sunt distribuite ubicuitar. Nucleazele secretate de pancreas participă la procesul de degradare a acizilor nucleici. Acţiunea nucleazică, în special cea exonucleazică, este proprie şi unor enzime implicate în biosinteza ADN, cum ar fi ADN polimeraza III.

O clasă importantă de endonucleaze specifice, denumite enzime de restricţie sau restrictaze, a fost evidenţiată la bacterii. Raţiunea existenţei acestor enzime este aceea de a distruge orice ADN străin care a pătruns în bacterie, prin calitatea de a recunoaşte secvenţe specifice de 4-6 nucleotide şi a cliva, într-un loc specific, câte o legătură fosfat diesterică de pe fiecare catenă.

Numărul de enzime de restricţie izolate şi purificate este impresionant.

De remarcat faptul că bacteriile îşi „cruţă" propriul ADN, marcându-l chimic, în general, prin metilarea specifică a unora dintre reziduurile de adenină şi citozină cuprinse în secvenţele recunoscute de enzimele de restricţie. Metilarea are loc sub acţiunea unor „metilaze de modificare" fie la gruparea amino a adeninei fie la C_5 al citozinei. Cel mai adesea acţiunea endonucleazică ca şi cea metilazică aparţine aceleiaşi proteine. Restrictaza Hind II, izolată din Haemophilus Influenzae, taie specific secvenţa:

5' C-T-Pirimidină ↓ Purină A-C 3'
3' G-A-Purină ↑ Pirimidină-T-G 5'

din orice ADN, cu excepţia celui care este metilat la nucleotidele adeninei din aceste secvenţe, adică a propriului ADN.

În cursul sintezei de ADN fiecare dintre catenele parentale serveşte ca matriţă a câte unei noi catene complementare; catenele nou sintetizate sunt imperativ modificate prin metilare specifică înaintea unui nou ciclu de replicare (modificare postreplicare).

Acest sistem de restricţie-modificare, propriu bacteriilor, defensiv, ingenios şi eficace pulverizează agresorul (fragmentele rezultate prin acţiunea enzimelor de restricţie sunt degradate apoi de exonucleazele bacteriene), în general un virus (bacteriofag).

Enzimele de restricţie, adevărate bisturie moleculare, permit tăierea selectivă a unor fragmente de ADN în scopul utilizării lor în tehnicile de clonare a ADN (vezi ingineria genetică).

Dintre diversele tipuri de enzime de restricţie, tipul II are legătură directă cu tehnologia ADN recombinant, spre deosebire de cele de tip I şi III care sunt enzime bifuncţionale manifestând atât activitate endonucleazică cât şi activitate metilazică.

IV.3. ACIZII DEZOXIRIBONUCLEICI

În 1868, Miescher a izolat, din celule spermatice de peşte, un compus conţinând fosfor pe care l-a numit nucleina, fiind izolat din nucleii celulelor respective. Structura covalentă a grupării prostetice, care a primit numele de acid dezoxiribonucleic (ADN), a fost stabilită în jurul anilor 1940.

Cu totul revoluţionară a fost demonstrarea de către Oswald Avery, Colin MacLeod şi Mclyn McCarty în 1943 a faptului că ADN este molecula eredităţii, că ea este purtătoarea informaţiei genetice. ADN extrem de pur, extras dintr-un pneumococ

virulent, provoacă transformarea genetică a unei suşe nevirulente de pneumococ. Virulenţa câştigată de aceasta din urmă este transmisă ereditar, prin includerea ADN injectat în ADN al celulei gazdă.

Informaţia genetică este înscrisă în secvenţa variabilă a nucleotidelor, elementele din care sunt constituiţi acizii nucleici. ADN conţine informaţia genetică completă pentru a specifica structura proteinelor unui organism. Definirea caracterelor morfologice şi funcţionale ale unei celule, al căror substrat este reprezentat de proteine, se realizează după programul înscris în ADN.

IV.3.1. STRUCTURA COVALENTĂ A ADN

Acizii dezoxiribonucleici sunt polidezoxiribonucleotide cu masa moleculară mare în care gruparea 3'–OH a unui dezoxiribonucleotid este legată la gruparea 5'–OH a dezoxiribonucleotidului adiacent printr-o legătură fosfat diesterică (Figura IV.6).

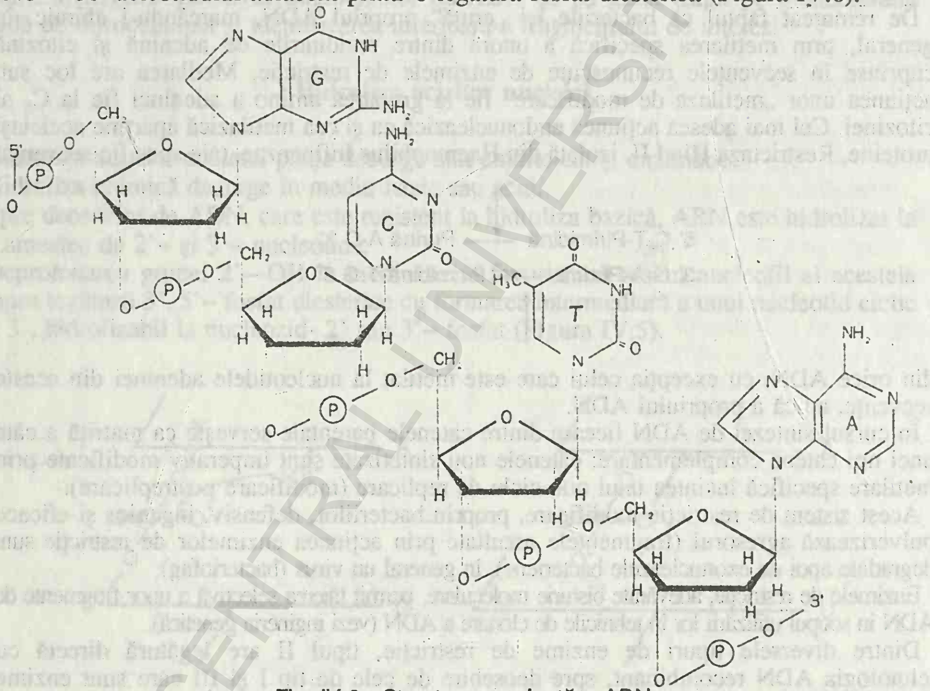


Fig. IV.6 - Structura covalentă a ADN

ADN conţine patru baze azotate şi anume: adenina, guanina, timina şi citozina. În secvenţa nucleotidelor corespunzătoare din macromoleculele de ADN este înscrisă informaţia genetică pe care acestea o cuprind.

IV.3.2. CONFORMAŢIA MOLECULEI DE ADN; TIPURI DE CONFORMAŢII

În stabilirea structurii secundare a ADN decisive au fost cercetările întreprinse de Chargaff, Rosalind Franklin şi Wilkins, ale căror concluzii le vom sumariza în cele ce urmează:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- analiza cromatografică, efectuată de către Chargaff pe molecule de ADN izolate din diverse specii, stabileşte o anumită relaţie cantitativă între cele 4 baze azotate. În toate tipurile de ADN studiate numărul de reziduuri de adenină este egal cu cel al reziduurilor de timină, iar cel al reziduurilor de guanină cu cel de citozină; numărul de baze purinice este egal cu cel de baze pirimidinice (A+G=T+C);

- difracţia razelor X, efectuată pe cristale de ADN de către Rosalind Franklin şi Maurice Wilkins, a demonstrat existenţa a două perioade de identitate de-a lungul axei lungi a moleculei: una mare, de 3,4 nm şi una mică, de 0,34 nm.

Pornind de la aceste date, cât şi de la necesitatea de a oferi o interpretare moleculară capacităţii de reproducere a informaţiei genetice conţinută în molecula ADN, ca trăsătură caracteristică a acesteia, Watson şi Crick au elaborat un model tridimensional al macromoleculei de ADN cu următoarele caracteristici:

- două lanţuri polidezoxiribonucleotidice antiparalele se răsucesc helicoidal şi în acelaşi sens în jurul unui ax comun, formând o dublă helice cu orientare dreaptă. Inelele glucidice, legate prin resturi fosfat, constituie scheletul extern al dublului helix, în timp ce bazele azotate, hidrofobe, sunt orientate spre interior şi perpendicular pe axa helixului. Toate grupările fosfat la pH = 7 sunt ionizate şi încărcate negativ;
- cilindrul ce încadrează dublul helix are diametrul de 2 nm;
- distanţa dintre planurile a două baze adiacente este de 0,34 nm; perioada de identitate este de 3,4 nm, deci structura se repetă după 10 perechi de baze azotate;
- stabilitatea dublului helix este asigurată atât de interacţiunile hidrofobe dintre bazele azotate cât şi de legăturile de hidrogen ce se stabilesc între bazele azotate de pe o catenă şi cele complementare de pe cealaltă catenă; multitudinea de legături van der Waals, stabilite între bazele azotate suprapuse, „stivuite" (stacked), prin suprafeţele lor de contact, contribuie major la stabilitatea moleculei.

Legăturile de hidrogen se stabilesc, invariabil, între o bază azotată purinică de pe o catenă şi una pirimidinică de pe cealaltă catenă. Împerecherea a două baze purinice

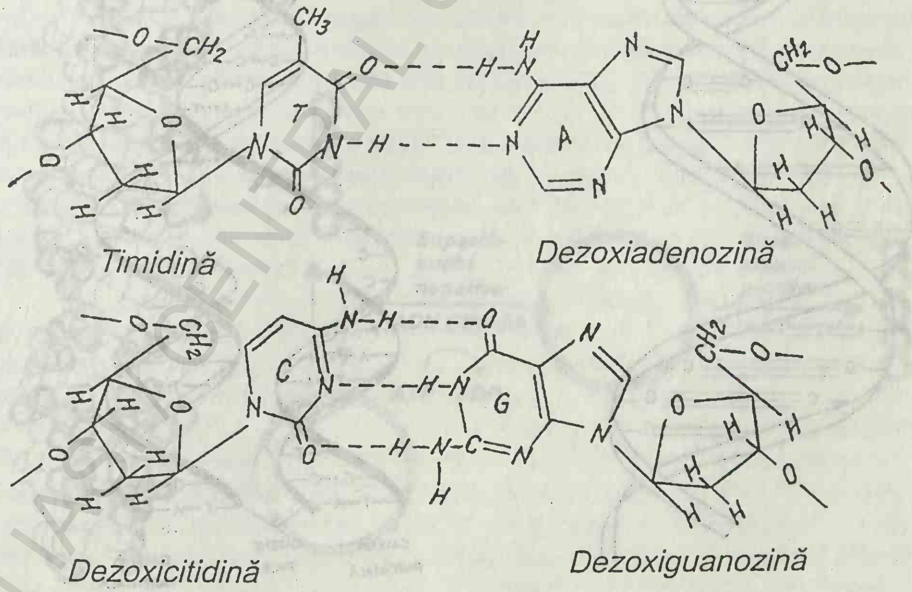


Fig. IV.7 - Baze complementare unite prin legături de hidrogen

este exclusă întrucât s-ar depăşi spaţiul oferit de dublul helix (diametrul constant, de 2 nm, de-a lungul axului), iar împerecherea a două baze pirimidinice ar face imposibilă stabilirea legăturilor de hidrogen, bazele azotate fiind situate prea departe una de alta. Bazele pereche sunt adenina-timina şi guanina-citozina, întrucât numai acestea pot stabili numărul maxim de legături de hidrogen, asigurând astfel conformaţia cu energia liberă cea mai mică, deci cea mai stabilă, moleculei de ADN. Adenina se leagă de timină prin două legături de hidrogen, iar guanina de citozină prin trei legături (Fig. IV.7). Cele două catene polinucleotidice nu sunt identice ci complementare, în sensul că, adeninei dintr-o catenă îi va corespunde întotdeauna timina de pe cealaltă catenă, iar guaninei - citozina. Succesiunea bazelor azotate dintr-o catenă dictează succesiunea bazelor azotate din cea de-a doua catenă: o catenă este replica celeilalte.

Însăşi dispoziţia structurilor hidrofobe, respectiv hidrofile, în mediul convenabil lor, conferă structurii ADN, maximum de stabilitate necesară; tăria legăturilor care asigură conformaţia moleculelor de ADN trebuie să fie suficient de mare pentru a-i menţine integritatea permiţând totodată flexibilitatea conformaţională a acesteia.

Modelul Watson-Crick este reprezentat în Figura IV.8.

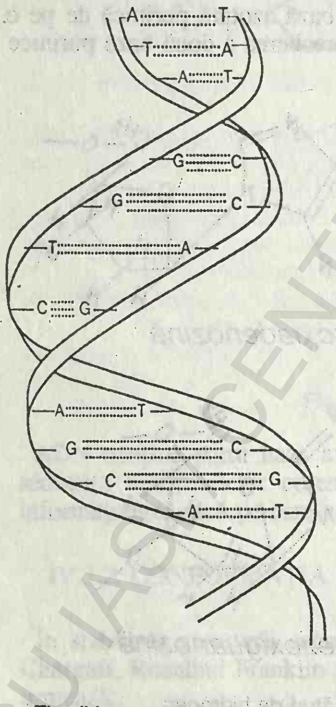


Fig. IV.8 - Structura dublu helicoidală a ADN

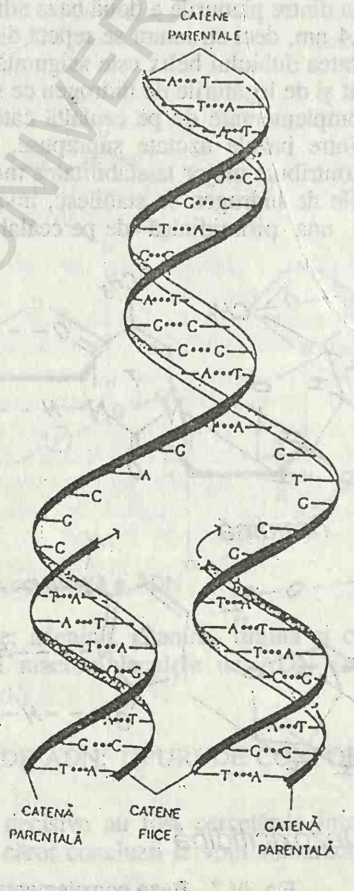


Fig. IV.9 - Autoreplicarea ADN

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Informaţia genetică cu privire la biosinteza de proteine rezidă în însăşi secvenţa bazelor azotate din catenele de ADN. Multiplele posibilităţi de variaţie a acesteia explică multitudinea de proteine ce pot fi sintetizate conform „instrucţiunilor" cuprinse în ADN.

Modelul Watson-Crick oferă elementele pentru explicarea capacităţii ADN de a stoca şi transmite informaţia înscrisă în secvenţa bazelor azotate. Fiecare dintre aceste catene va servi ca matriţă (template) pentru sinteza unei catene noi, complementară cu catena parentală, rezultând astfel două molecule fiice identice cu ADN parental (Figura IV.9).

Conformaţia dublu helicoidală descrisă de Watson-Crick corespunde formei predominante de ADN în celulă - forma B.

Există dovada că, departe de a fi o moleculă statică, molecula de ADN adoptă şi alte conformaţii.

Conformaţia de tip A corespunde tot unei duble helice drepte dar este mult mai compactă; pasul helicei este de 2,8 nm iar numărul de baze per tur este de 11. Ca şi în cazul ADN-B şi în ADN-A predomină conformerii anti.

Conformaţia de tip Z (Z de la zig zag) corespunde la o helice stângă având 12 perechi de baze per tur, pasul helicei fiind de 4,56 nm. Ea întrerupe „monotonia" helicei drepte atunci când întâlneşte structuri speciale (anumite succesiuni de secvenţe alternative de purine şi pirimidine) fiind prezentă atât în condiţii fiziologice cât şi în condiţii speciale (la concentraţii mari de cationi). Într-o succesiune GC dezoxinucleotidul guaninei adoptă

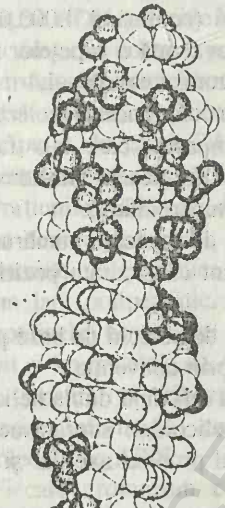


Fig. IV.10 - Conformaţia Z a ADN

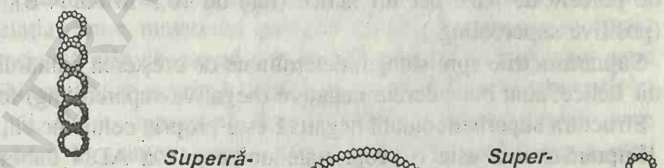


Fig. IV.11 - Molecule de ADN superspiralate

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

conformaţia syn iar cel al citozinei pe cea anti, ceea ce face ca lanţul să evolueze în zig-zag între cele două conformaţii (Fig. IV.10).

Minoritară faţă de dubla helice Watson-Crick şi având o stabilitate mai mică decât ea, prezenţa acestei conformaţii are, probabil, o semnificaţie biologică; se sugerează că ar reprezenta un semnal de recunoaştere sau ar juca un rol important în variabilitatea genetică a organismelor (aceste regiuni sunt, în general, predispuse la mutaţii).

Se admite că în timpul proceselor de replicare sau transcriere a ADN, procese implicând „deschiderea" moleculei, energia eliberată ar fi utilizată pentru stabilizarea structurilor Z, natural instabile. Dacă este aşa, rezultă că în cursul acestor procese au loc remanieri ale conformaţiei ADN, variabilă în cursul existenţei celulei.

Deşi prezenţa acestei conformaţii in vivo nu este ferm dovedită, există argumente (in vitro) că structura Z modifică interacţiunile ADN-proteine, prin excelenţă importante în replicare, transcriere, repararea leziunilor ADN. Se speculează ideea de limbaj conformaţional receptat ca mesaj.

IV.3.3. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE ŞI EUCARIOTE

La procariote, o moleculă unică de ADN, de mari dimensiuni (conţinând 4.000.000 perechi de baze) şi în general circulară (formată prin legarea covalentă a capetelor 5', 3'), alcătuieşte un cromozom. Lungimea conturului de ADN cromozomial este de ~1,4 mm, deci cu mult mai mare decât dimensiunile unei celule de Escherichia coli. Evident, molecula ADN va trebui să adopte în celulă o formă cât mai compactă, care s-o facă compatibilă cu spaţiul oferit de către aceasta. ADN circular formează într-adevăr superhelixuri prin suprarăsuciri, superspiralizări (supertwisting, supercoiling).

Suprarăsucirile spre dreapta (sensul dublei helice), determinate de scăderea numărului de perechi de baze per tur helice (faţă de 10,5 în ADN-B), sunt considerate pozitive (positive supercoling).

Suprarăsucirile spre stânga, determinate de creşterea numărului de perechi de baze per tur helice, sunt considerate negative (negative supercoiling) tot prin convenţie.

Structura superhelicoidală negativă este proprie celulelor vii, ea relaxând dubla helice.

Suprarăsucirea este o proprietate universală a ADN dublu helicoidal; suprarăsuciri apar nu numai atunci când un ADN circular se răsuceşte în jurul propriei axe dar şi în cazul ADN liniar-deci şi la eucariote.

Formele superhelicoidale sunt în raport cu forma helicoidală, ca şi una faţa de cealaltă, topoizomeri. Enzime specifice, denumite topoizomeraze, catalizează aceste modificări topologice, interconvertind izomerii topologici (topologia-ramură a matematicii, studiază deformările geometriei unor structuri).

O topoizomerază, prezentă în procariote, este ADN giraza care are abilitatea de a produce sau desfiinţa suprarăsuciri negative. Două dintre subunităţile acestei enzime-tetramer (două perechi de subunităţi A şi B), acelea care introduc superhelixuri negative, au şi activitate ATP-azică, spre deosebire de subunităţile specializate în desfiinţarea acestora.

Pe lângă ADN reprezentând materialul cromozomial, ce cuprinde setul complet de gene pentru specificarea tuturor caracterelor celulei, bacteriile conţin şi mici cantităţi de ADN circular, extracromozomial, care se găseşte în citoplasmă. Aceste molecule de ADN se numesc plasmide şi conţin o cantitate redusă de informaţie genetică. Pe lângă alte gene, ele conţin şi gene care specifică anumite proteine ce le conferă rezistenţa la antibiotice. Plasmidele pot migra de la o celulă cu rezistenţă la un antibiotic la altă celulă, cu sensibilitate la antibioticul respectiv, făcând-o şi pe aceasta rezistentă. Rezistenţa la antibiotice, transferabilă nu numai în cadrul aceleiaşi specii bacteriene ci şi de la o specie la alta, pune probleme serioase antibioterapiei.

Plasmidele s-au dovedit a fi instrumente ideale de manipulare a genelor. Manifestând adesea autonomie faţă de ADN cromozomial, plasmidele se autoreplică extrem de rapid. Posibilitatea încorporării unui fragment de ADN străin într-un plasmid, prin tehnicile ingineriei genetice, şi reintroducerea plasmidului modificat într-un organism gazdă permite obţinerea unor mari cantităţi din gena străină sau din proteina specificată de aceasta.

În cazul eucariotelor, cea mai mare cantitate de ADN se găseşte în nucleu care, spre deosebire de procariote, este delimitat de citoplasmă printr-o membrană.

În perioadele de repaos ale celulei, deci în afara perioadelor de diviziune, materialul genetic se găseşte sub formă de cromatină, un material amorf, dispersat în nucleu, care conţine ADN, proteine bazice denumite histone şi proteine nehistonice denumite hertone.

În timpul mitozei şi puţin înainte de aceasta, cromatina se condensează şi se subdivide în cromozomi care sunt complexe ADN-proteine. Numărul acestora depinde de specie; astfel, celulele somatice umane conţin 46 de cromozomi grupaţi în 23 de perechi, vulpea 34, puiul de găină 78 etc. Fiecare cromozom conţine o singură moleculă de ADN linear lungimea sa variind de la un cromozom la altul.

Porţiunile ADN care conţin informaţia genetică cu privire la sinteza unei proteine au fost denumite, iniţial, gene. S-a arătat ulterior că proteinele formate din mai multe subunităţi polipeptidice sunt codificate de un grup de gene, fiecărei gene corespunzându-i un lanţ polipeptidic. Relaţia dintre materialul genetic (ADN) şi expresia sa finală (proteinele) este corect exprimată prin conceptul o genă - un lanţ polipeptidic; tot gene sunt şi fragmentele de ADN care nu se exprimă final în proteine, ci în acizi ribonucleici de transfer şi ribozomiali. Gena reprezintă deci fragmentul cromozomial care conţine informaţia cu privire la sinteza unui singur lanţ polipeptidic sau a unei molecule de ARN.

Fiecare cromozom conţine un set unic de gene. Totalitatea genelor cuprinse în cromozomii unei celule constituie genomul acesteia. (Genomul haploid uman constă din $3,5 \times 10^9$ perechi de baze).

În general, genele eucariotelor se întâlnesc o singură dată în genom. Unele gene sunt prezente, însă, în copii multiple, de exemplu genele care corespund tuturor tipurilor de ARN_r, genele care codifică histonele, genele care codifică cheratina la păsări şi cornute etc.

Moleculele de ADN eucariot prezintă, spre deosebire de ADN procariot, şi anumite segmente, relativ mici, noninformaţionale, care se pot repeta de milioane sau numai de mii de ori (ADN satelit). Aceste secvenţe repetitive, cuprinzând zeci sau sute de perechi de baze, sunt suspectate a îndeplini roluri în reglare, în arhitectura moleculei de ADN, dar dovezile în acest sens sunt încă neconvingătoare.

Surpriza cea mare privind organizarea genomului eucariot a oferit-o descoperirea discontinuităţii genelor. O genă conţinând informaţia privind structura unui lanţ polipeptidic este întreruptă de secvenţe care nu sunt traduse via ARN_m, care nu se vor exprima în structura polipeptidului dat. Secvenţele de ADN traductibile, dintr-o anumită genă structurală, s-au denumit exoni (expressed regions), iar celelalte introni (intervening sequences). Cercetările din ultimii ani au dus la concluzia că discontinuitatea genelor, departe de a fi o excepţie, reprezintă o trăsătură comună a genomului organismelor superioare (excepţie ar face genele care codifică histonele şi interferonul).

Afirmaţia unor geneticieni după care genomul eucariot este organizat pe linia relaxării şi extravaganţei nu pare, deocamdată, extravagantă.

Celulele eucariote conţin, pe lângă ADN nuclear, şi ADN localizat în mitocondrii, diferit atât prin structura, cât şi prin unele proprietăţi, de cel nuclear. ADN mitocondrial se prezintă ca un duplex circular, cu masă moleculară relativ mică şi o capacitate de renaturare surprinzătoare.

Prezenţa ADN mitocondrial conferă acesteia o oarecare autonomie genetică, o parte dintre proteinele mitocondriale, mai ales cele implicate în biogeneza sa, sintetizându-se pe tipar de ADN propriu. Printre aceste proteine semnalăm: NADH-ubichinono oxidoreductaza (inhibată de rotenonă), apocitocromul b, subunităţi ale citocrom oxidazei, diferite proteine structurale.

Majoritatea proteinelor mitocondriale sunt însă specificate de gene nucleare, sintetizate în citoplasmă şi apoi importate, graţie recunoaşterii lor de către receptorii specializaţi de pe suprafaţa mitocondriei.

Este surprinzător faptul că setul de gene ale ADN mitocondrial (care specifică proteine mitocondriale) nu este identic la diferite organisme, proteine omoloage fiind codificate la unele de către ADN mitocondrial, iar la altele de către ADN nuclear. Ideea unui transfer de gene între nucleu şi mitocondrie pare plauzibilă ţinând seama de faptul că ADN nuclear poate încorpora ADN exogen pătruns în celulă.

Se pune firesc întrebarea: de ce alte organite celulare lasă pe seama ADN nuclear întreaga responsabilitate a biogenezei lor iar mitocondria cointeresează atât ADN nuclear cât şi ADN propriu? Indiscutabil, prezenţa ADN mitocondrial nu poate fi un capriciu sau un accident al evoluţiei, menţinerea unui sistem genetic separat constituind o substanţială investiţie, impusă probabil de o necesitate încă neînţeleasă.

IV.3.4. ARHITECTURA GENOMULUI EUCARIOT

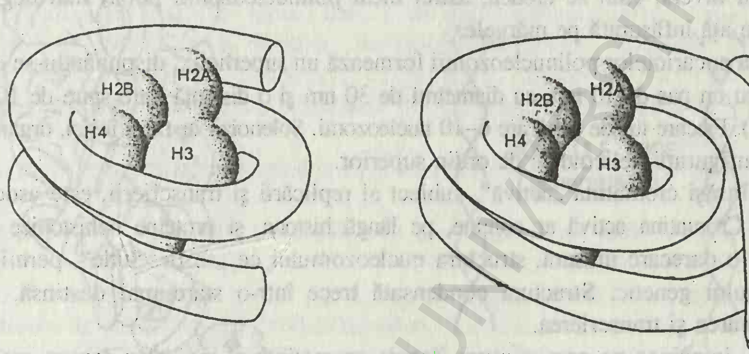
Cantitatea de ADN în celulele eucariotelor este semnificativ mai mare decât la procariote. Lungimea conturului de ADN dintr-o singură celulă umană este de ~2 m. Pentru ca o moleculă de ADN să „încapă" în spaţiul nuclear, strâmt, materialul genetic se organizează corespunzător, un rol important revenind histonelor, proteine bazice, cu masă moleculară mică, asociate ADN. Se cunosc 5 clase de histone şi anume H_1, H_{2A}, H_{2B}, H_3, H_4. Histonele H_{2A} şi H_{2B} au un conţinut foarte bogat în lizină, în timp ce H_3 şi H_4 sunt foarte bogate în arginină. Întrucât la pH fiziologic radicalii celor doi aminoacizi sunt protonaţi, histonele stabilesc legături saline cu anionii fosfat din molecula ADN, ceea ce permite formarea de complexe ADN-histone.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

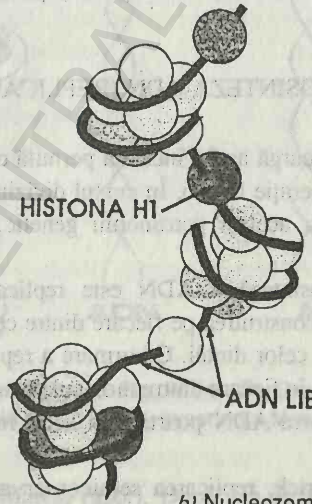
Cantitatea mare de histone, existenţa strictă a 5 tipuri de histone în toate celulele eucariote ca şi constanţa structurii lor pe scara evoluţiei au reactualizat problema importanţei acestora în organizarea cromozomilor: unde se află aceste proteine în cromozom, cum sunt dispuse şi ce rol au de îndeplinit? Este asocierea histonelor cu ADN răspunzătoare de condensarea materialului genetic, făcând posibilă încadrarea în spaţiul nuclear cu diametrul de 1/10 nm a unor molecule care, extinse, ar măsura 2 m?

Cercetările ultimelor decade, utilizând un întreg arsenal de tehnici de performanţă (microscopie electronică, difracţia neutronică etc.), au dus la concluzii ce par să dezlege „misterul" histonelor.

Studiile de difracţie a razelor X (efectuate de Wilkins şi Buzzati) au dus la constatarea surprinzătoare că, cromatina (cromozomii interfazici) prezintă structuri repetabile la intervale de ~10 nm.



Nucleozom „miez" a. Nucleozom solitar



b) Nucleozomi reuniţi prin ADN liber

Fig. IV.12

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În studiile de microscopie electronică cromatina are aspectul unor mărgele pe aţă. „Mărgelele“ reprezintă o suită de particule sferice cu diametru de ~10 nm, iar „aţa“, porţiuni de ADN liber. Unitatea repetitivă de 10 nm, evidenţiată prin studiile de microscopie electronică, a fost denumită nucleozom (Fig. IV.12a). Fiecare unitate repetitivă-nucleozom-cuprinde un octamer histonic constituit din $2H_{2A}$, $2H_{2B}$, $2H_3$, $2H_4$, ce formează un fel de cilindru turtit cu dimensiunile 11 x 11 x 5,5 nm. Dubla helice a ADN înfăşoară de aproximativ două ori fiecare miez histonic al nucleozomului. ADN asociat octamerului este constituit din ~140 perechi de baze: (nucleozom „miez“). Între doi nucleozomi „miez“ adiacenţi se găseşte ADN liber, 20-60 perechi de baze, la care este legată histona H_1 (Figura IV.12.b).

Studiile de difracţie neutronică au demonstrat că ADN împachetează octamerul histonic şi nu invers, cum se credea, astfel încât polinucleozomii pot fi mai degrabă asimilaţi cu o aţă înfăşurată pe mărgele.

În cromatina eucariotelor polinucleozomii formează un superhelix, dispunându-se după un solenoid cu un pas de 10 nm, cu diametrul de 30 nm şi o distanţă între spire de 10 nm (Figura IV.13). Fiecare tur de spiră are 6–10 nucleozomi. Solenoizii ar fi, ei înşişi, organizaţi în fibre cu configuraţii helicoidale de ordin superior.

Se pare că însăşi cromatina „activă“, subiect al replicării şi transcrierii, este asociată cu histonele. Cromatina activă ar conţine, pe lângă histone, şi proteine nehistonice care modifică, într-o oarecare măsură, structura nucleozomului ce „se deschide“, permiţând citirea mesajului genetic. Structura condensată trece într-o stare mai destinsă, care permite replicarea şi transcrierea.

Indiscutabil, imaginea pe care o avem despre cromatină, şi mai ales despre modificările pe care aceasta le poate suferi, este incompletă şi perfectibilă.

IV.3.5. BIOSINTEZA ADN (REPLICAREA)

Biosinteza ADN trebuie să decurgă astfel încât să permită conservarea şi transmiterea informaţiei genetice de la o generaţie la alta. În cursul diviziunii celulare, fiecare celulă generează două celule fiice cu acelaşi patrimoniu genetic, conţinând, deci, aceeaşi cantitate şi calitate de ADN.

Modalitatea specifică de biosinteză a ADN este replicarea, respectiv desfacerea duplexului de ADN parental şi construirea pe fiecare dintre cele două catene a câte unei catene complementare - replica celor dintâi. Ca urmare a replicării apar două molecule ADN fiice identice cu parentala, în fiecare dintre moleculele nou formate conservându-se o catenă veche, parentală. Sinteza ADN poartă, din acest motiv, numele de replicare semiconservativă (Fig. IV.9).

Intuită de către Watson şi Crick, replicarea semiconservativă a fost confirmată de Meselson şi Stahl. Cultivând o bacterie (Escherichia coli) într-un mediu conţinând ca unică sursă de azot NH_4Cl marcată cu ^{15}N, se obţine ADN bacterian integral marcat. Bacteriile sunt transferate apoi pe un mediu conţinând NH_4Cl nemarcată. ADN extras după prima diviziune are o densitate intermediară între aceea a ADN marcat cu ^{15}N

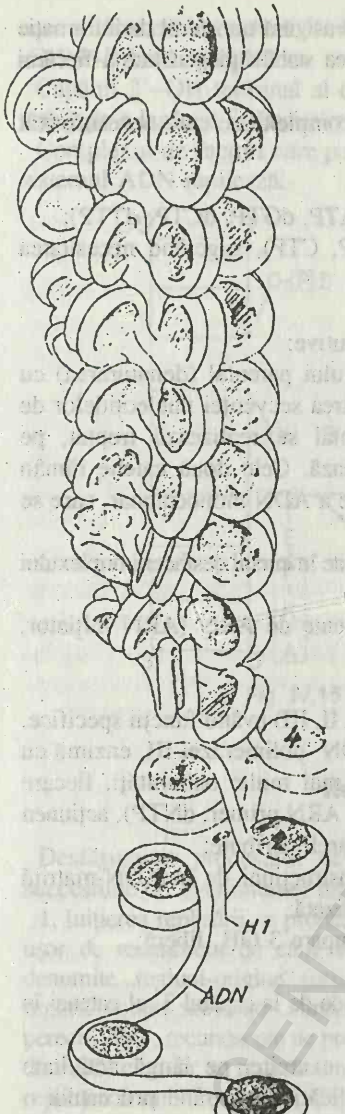


Fig. IV.13 - Polinucleozomi constituind un solenoid

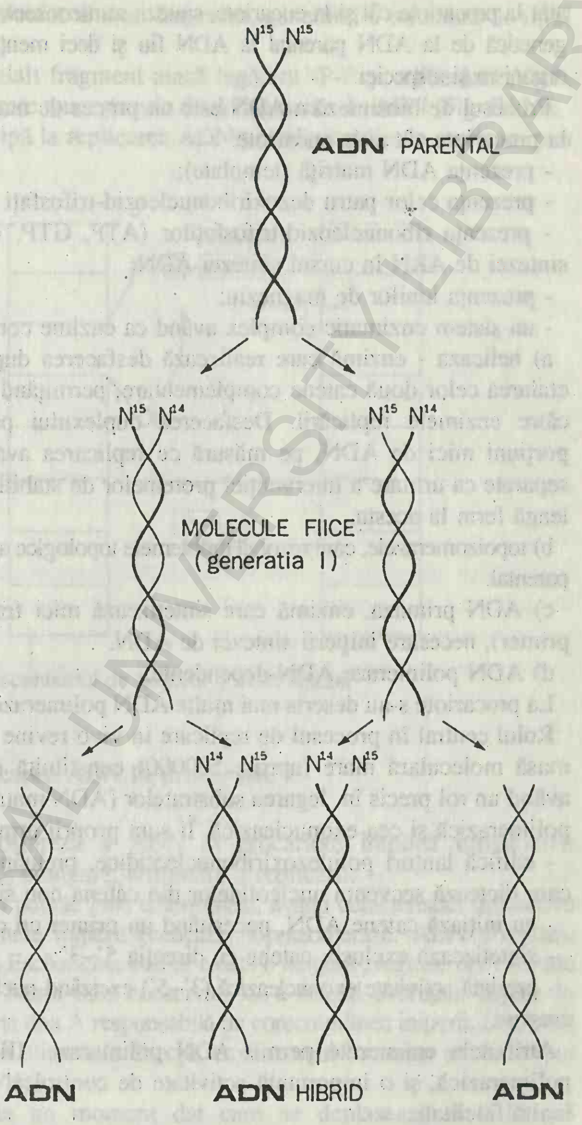


Fig. IV.14 - Replicarea semiconservativă; experienţa Meselson - Stahl

(greu) şi aceea a ADN nemarcat (uşor). După cea de a doua diviziune, pe lângă ADN cu densitate intermediară (50% din ADN total), apare, în aceeaşi proporţie, ADN uşor (Fig. IV.14). Desigur, în următoarele generaţii bacteriene procentul de ADN uşor va creşte.

Experienţa, devenită clasică, a lui Meselson şi Stahl a reprezentat dovada de necontestat a mecanismului de replicare a ADN. Considerat mecanism general de sinteză (in vivo) a ADN

atât la procariote cât şi la eucariote, sinteza semiconservativă asigură transferul de informaţie genetică de la ADN parental la ADN fiu şi deci menţinerea stabilităţii genetice a fiecărui organism şi a speciei.

Procesul de biosinteză a ADN este un proces de mare complexitate care necesită, atât la procariote cât şi la eucariote:

- prezenţa ADN matriţă (template);
- prezenţa celor patru dezoxiribonucleozid-trifosfaţi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- prezenţa ribonucleozid-trifosfaţilor (ATP, GTP, UTP, CTP), sugerând necesitatea sintezei de ARN în cursul sintezei ADN;
- prezenţa ionilor de magneziu;
- un sistem enzimatic complex având ca enzime constitutive:

a) helicaza - enzimă care realizează desfacerea duplexului parental (denaturarea) cu etalarea celor două catene complementare, permiţând citirea secvenţei nucleotidelor de către enzimele replicării. Desfacerea duplexului parental se realizează treptat, pe porţiuni mici de ADN, pe măsură ce replicarea avansează. Cele două catene rămân separate ca urmare a intervenţiei proteinelor de stabilizare a ADN monocatenar, care se leagă ferm la acesta.

b) topoizomerazele, care rezolvă problemele topologice apărute în cursul desfacerii duplexului parental.

c) ADN primaza, enzimă care sintetizează mici fragmente de ARN (ARN iniţiator, primer), necesare iniţierii sintezei de ADN.

d) ADN polimeraze ADN-dependente.

La procariote s-au descris mai multe ADN polimeraze (I, II, III) având funcţii specifice.

Rolul central în procesul de replicare in vivo revine ADN polimerazei III, enzimă cu masă moleculară mare (aprox. 500000) constituită din mai multe subunităţi, fiecare având un rol precis în legarea substratelor (ADN matriţă, ARN primer, dNTP), acţiunea polimerazică şi cea exonucleazică. Îi sunt proprii următoarele atribute:

- edifică lanţuri polidezoxiribonucleotidice, preluând instrucţiuni de la ADN-matriţă care dictează secvenţa nucleotidelor din catena nou sintetizată;
- nu iniţiază catene ADN, necesitând un primer cu o grupare 3'OH liberă;
- sintetizează exclusiv catene cu direcţia 5'–3';
- prezintă activitate exonucleazică (3'–5') excizând nucleotide de la capătul 3' al catenei în creştere.

Atributele enumerate permit ADN polimerazei III să exercite, pe lângă activitate polimerazică, şi o importantă activitate de control al replicării, asigurând procesului o înaltă fidelitate.

Funcţia ADN polimerazei II este încă obscură.

ADN polimerazei I îi revin sarcini speciale în evenimentele replicării şi reparării leziunilor ADN, derivate dintr-un atribut pe care nu-l împărtăşeşte cu celelalte ADN polimeraze şi anume activitatea 5'-3' exonucleazică.

În cazul eucariotelor există o multitudine de ADN polimeraze având atribute specifice.

e) ADN ligaza — enzimă ce reuneşte fragmentele ADN rezultate în cursul replicării. ADN-ligaza catalizează formarea unei legături fosfat diesterice între extremitatea 3'-OH a unui fragment de ADN şi extremitatea 5' monofosfat a altuia. Enzima necesită prezenţa unui donor al unui rest de acid adenilic (ATP la eucariote, NAD la procariote)

care se fixează la capătul 5' monofosfat al unui fragment, generând o structură de tipul -O-P-P-Riboză-Adenină.

Capătul 3'–OH terminal al celuilalt fragment atacă legătura -P-P şi, eliberând AMP, stabileşte o legătură fosfatdiesterică care reuneşte cele două fragmente de ADN (Fig. IV.15).

Complexul de factori care participă la replicarea ADN poartă numele de replizom sau sistemul ADN replicază.

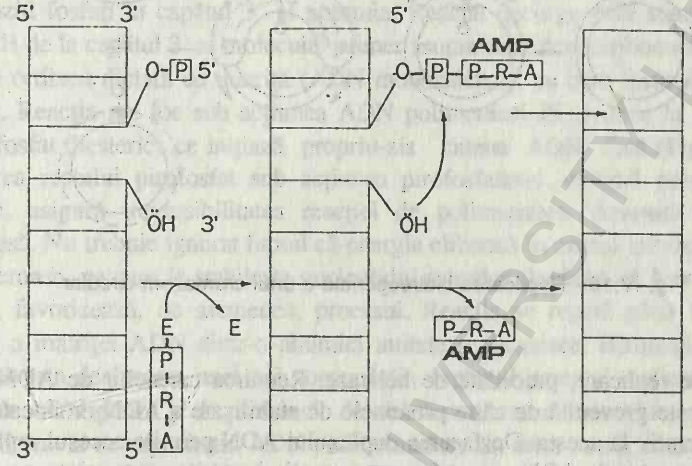


Fig. IV.15 - Mecanismul de acţiune a ADN ligazei

Replicarea ADN la procariote

Desfăşurarea procesului de biosinteză a ADN la procariote implică următoarea succesiune de evenimente: iniţiere, elongare, terminare a replicării.

1. Iniţierea replicării se produce în puncte bine determinate, având caracteristici distinctive uşor de recunoscut de către enzimele iniţierii (helicaze, topoizomeraze, ADN primaze), denumite „regiuni-origine" (ori). La Escherichia coli ar exista o singură „regiune ori". Aceste regiuni conţin secvenţe „consens" foarte bine conservate de-a lungul evoluţiei, bogate în perechi A=T, recunoscute de proteina dna A responsabilă de corectitudinea iniţierii. Duplexul de ADN circular se replică simultan în ambele direcţii; cromozomul bacterian are în timpul replicării forma literei theta. (Fig. IV.16).

Regiunea activă în replicare la un moment dat care se deplasează de-a lungul duplexului parental este desemnată drept „bifurcaţie de replicare". Pe cromozomul bacterian evoluează două bifurcaţii de replicare, una în sens orar, cealaltă în sens antiorar. Replicarea bidirecţională s-a dovedit a fi uzuală atât la bacterii cât şi la virusuri.

Iniţierea replicării parcurge două etape:

a) desfacerea duplexului parental pe anumite porţiuni — replicatori — sub acţiunea helicazelor (proteine dna B); procesul, presupunând ruperea legăturilor de hidrogen dintre bazele complementare, se produce cu un substanţial consum de energie (ATP). Desfacerea duplexului parental (denaturarea acestuia), realizată iniţial pe o porţiune mică de ADN (în „regiunea ori"), continuă de-a lungul moleculei pe măsura înaintării

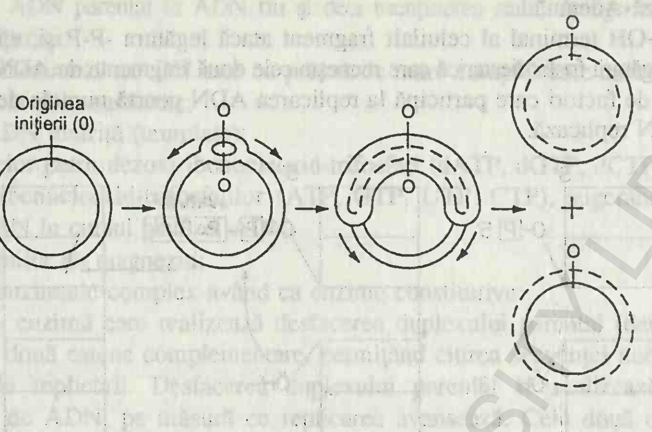


Fig. IV.16 - Replicarea bidirecționalǎ a unui cromozom circular

bifurcațiilor de replicare, precedate de helicaze. Reunirea catenelor de ADN formate (renaturarea) este prevenită de către proteinele de stabilizare a ADN monocatenar care se leagă cooperativ la acesta. Desfacerea duplexului ADN permite accesul replizomului la fiecare dintre catenele ADN parental, ce vor constitui matrițe pentru sinteza a câte unei catene fiice; ilustrarea procesului se va raporta la una dintre bifurcațiile de replicare.

Întrucât duplexul circular se desface (se desrăsuceşte) în regiunea bifurcației de replicare cu o viteză de aproximativ 100 de revoluții/secundă, apar, inevitabil, supertorsiuni, regiuni superhelicoidale, dincolo de limita bifurcației de replicare. Într-o moleculă circulară, avansarea bifurcației de replicare generează supertorsiuni pozitive, care pot bloca replicarea. Am văzut că ADN-giraza (topoizomeraza II) introduce în molecula ADN supertorsiuni negative, astfel încât constrângerile impuse de avansarea bifurcației de replicare sunt în mare măsură contracarate şi replicarea nu este stânjenită. Altfel spus, ADN-giraza, introducând torsiuni negative ale dublei helice, în sens contrar celor create de înaintarea bifurcației de replicare, compensează, în avans, constrângerile impuse de derularea catenelor ADN. Interesant de notat că acidul nalidixic (Negram) şi derivații săi fluorurați (norfloxacin), superiori prin toxicitatea redusă şi prin faptul că nu dezvoltă rezistență plasmidică transferabilă, suprimă creşterea şi multiplicarea bacteriană prin inhibarea ADN-girazei.

Torsiunile pozitive pot fi eliminate şi prin acțiunea topoizomerazei de tip I. ADN-topoizomeraza I acționează ca o endonuclează reversibilă. Ea incizează o legătură fosfat diesterică de pe una dintre catenele ADN, permițând astfel celor două capete ale ADN să se rotească unul față de celălalt; starea superhelicoidală este desființată. Acțiunea de „suveică" a topoizomerazei I duce la relaxarea termodinamic avantajoasă a ADN. Este necesară, desigur, refacerea legăturii fosfat diesterice incizate. Întrucât energia legăturii fosfat diesterice originale a fost conservată într-o legătură fosfat esterică, implicând tirozina din centrul activ al enzimei, reacția este reversibilă şi nu necesită aport energetic (Fig. IV.17). Conlucrarea ambelor categorii de topoizomeraze reuşeşte să scadă stress-ul topologic produs de helicază.

b) Construirea unei molecule de ARN iniţiator (primer) al polimerizării dezoxiribonucleozid trifosfaţilor în „regiunea ori". Primerul este reprezentat de un ARN de mici dimensiuni (5–10 ribonucleotide) şi este realizat prin acţiunea ADN-primazei, asistată de alte protein-enzime (complexul primozom). De menţionat că etapa de iniţiere a replicării controlează întregul proces, prin mecanisme încă neelucidate.

2. Elongarea (alungirea) ARN iniţiator constă în adăugarea succesivă de dezoxiribonucleozid fosfaţi la capătul 3' al acestuia. Reacţia decurge prin atacul nucleofil al grupei OH de la capătul 3' al moleculei primer asupra unui dezoxiribonucleozid trifosfat aliniat în ordinea dictată de matriţă (ADN monocatenar), cu care formează legături de hidrogen. Reacţia are loc sub acţiunea ADN polimerazei III şi duce la formarea unei legături fosfat diesterice ce iniţiază propriu-zis catena ADN fiică (Fig. IV.18).

Clivarea restului pirofosfat sub acţiunea pirofosfatazei, enzimă prezentă în toate ţesuturile, asigură ireversibilitatea reacţiei de polimerizare, devenită termodinamic avantajoasă. Nu trebuie ignorat faptul că energia eliberată în cursul interacţiunilor slabe, dar numeroase, pe care le stabileşte nucleotidul introdus (legături de hidrogen, forţe de stivuire), favorizează, de asemenea, procesul. Reacţia se repetă până la parcurgerea integrală a matriţei ADN dintr-o anumită unitate replicatoare. Bifurcaţia de replicare avansează prin desfacerea unei noi porţiuni din duplexul parental realizată de helicază, asistată de ADN girază şi de proteinele de stabilizare a monocatenelor.

Ţinând seama de capacitatea ADN polimerazelor, din orice sursă, de a cataliza numai sinteza unui lanţ polinucleotidic cu direcţia 5'→3', ar rezultă că numai catena cu direcţia 3'→5 dintr-o bifurcaţie de replicare poate fi copiată. Totuşi, sinteza catenei având ca matriţă catena cu direcţia 5'→3' se face tot în direcţia 5'→3', ea evoluând, formal, în direcţie opusă deplasării bifurcaţiei de replicare.

Replicarea catenei 5'→3' şi construirea unei replici cu direcţia 5'→3' este, evident, discontinuă. Odată cu avansarea bifurcaţiei de replicare (dilatarea replicatorului), noi molecule de ARN primer vor fi sintetizate la capătul 3' al catenei parentale, molecule pe care se vor construi fragmente mici de ADN, denumite fragmente Okazaki. Acestea au dimensiuni de 1000–2000 nucleotide la procariote şi de numai 150–200 la eucariote.

Excluderea ARN primeri din catenele nou-formate, nucleotid după nucleotid, prin acţiunea exonucleazică a ADN polimerazei I, presupune obligativitatea de a „umple" golurile rămase cu dezoxiribonucleotide. Operaţia este efectuată tot de ADN polimeraza I, în conformitate cu rolul său polimerazic. Fragmentele ADN rezultate vor fi sudate prin acţiunea ADN ligazei, cu consum de ATP.

În Figura IV.19 sunt redate etapele replicării pe una dintre bifurcaţiile de replicare. Evident, în timp ce sinteza uneia dintre catene este continuă, sinteza celeilalte este discontinuă; ele au fost desemnate drept catenă „în avans" (leading strand) respectiv catenă „în întârziere" (lagging strand). Replicarea moleculei de ADN este semidiscontinuă.

Cum replicarea este bidirecţională, pe cealaltă bifurcaţie de replicare evenimentele decurg identic.

3. Terminarea replicării are loc atunci când cele două bifurcaţii de replicare se întâlnesc într-o regiune opusă regiunii „ori". Proteine specifice semnalizează oprirea replicării prevenind acţiunea helicazelor.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

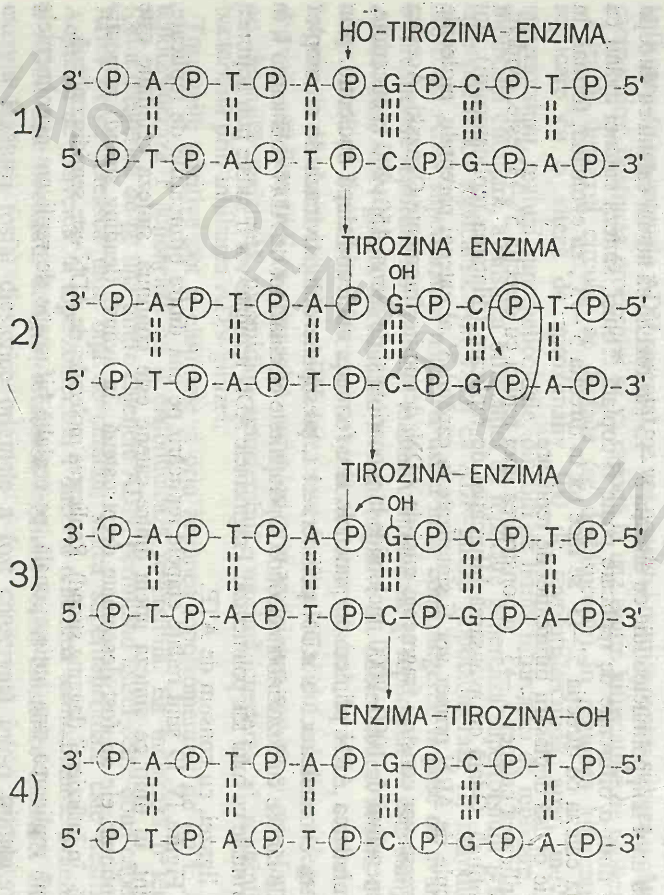


Fig. IV.17 - Reacţia catalizată de ADN topoizomeraza I

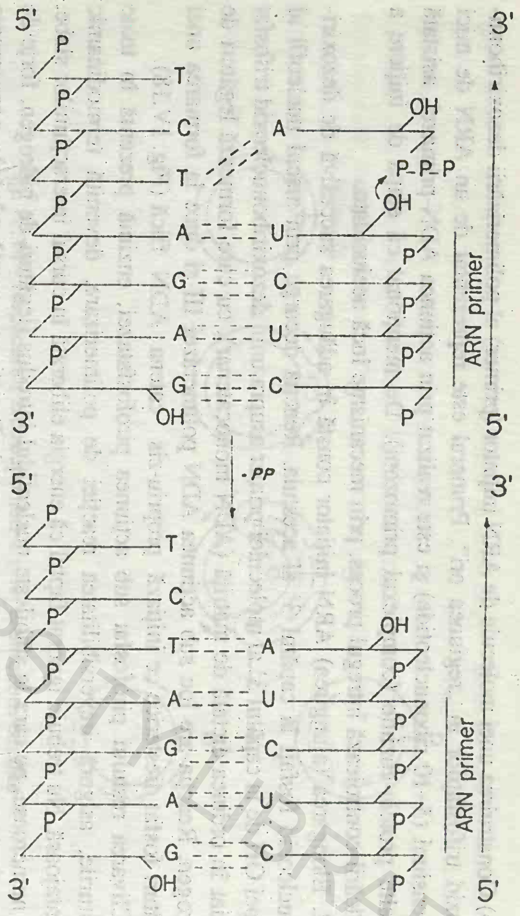


Fig. IV.18 - Elongarea primerului la capătul 3'OH

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

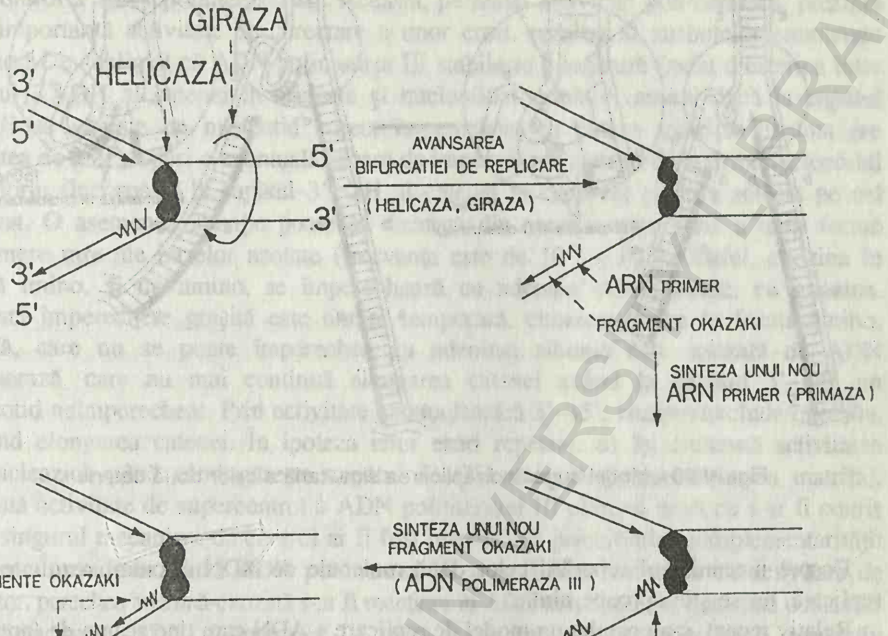


Fig. IV.19 - Etapele biosintezei ADN

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

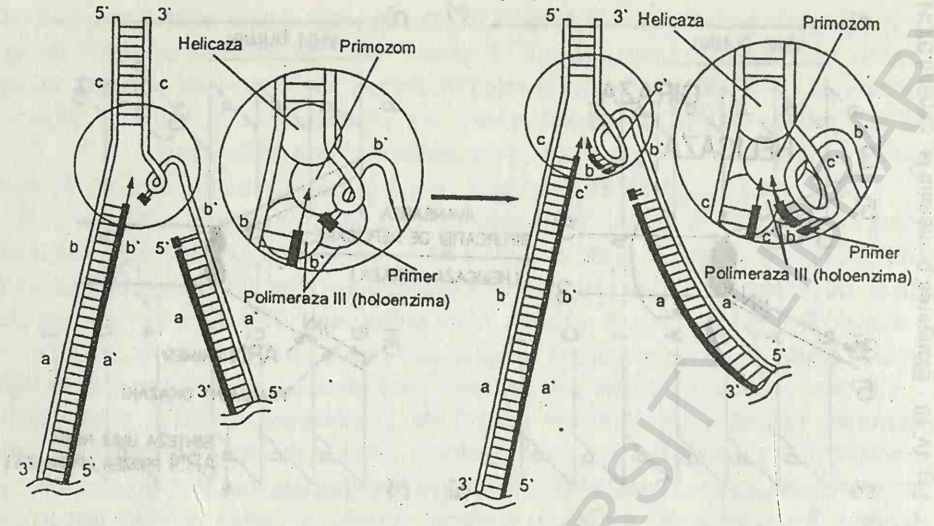


Fig. IV.20 - Model sugerând replicarea simultană a celor două catene

Despre mecanismul separării celor două molecule de ADN circular, rezultate prin replicare, nu se ştie aproape nimic.

Relativ recent, s-a postulat un model de replicare a ADN care ţine seama de faptul că aceasta se desfăşoară in vivo cu viteze egale pentru ambele catene (Fig. IV.20), care admite că:

1. replizomul este ancorat la membrana nucleară, deci relativ fix, iar molecula de ADN îl „tranzitează";

2. formarea unei bucle (loop) de către catena matriță cu direcţia 5'→3' permite catenei „lagging" să fie sintetizată simultan şi în aceeaşi direcţie cu catena „leading", cea a bifurcaţiei de replicare.

3. sinteza celor două catene este concomitentă, fiecare dintre ele devenind substrat pentru subunităţi diferite ale ADN polimerazei III care este un dimer asimetric.

Subunităţile cu activităţi polimerazice ale holoenzimei ar diferi prin aceea că subunitatea responsabilă de sinteza catenei „leading" se asociază ferm cu o subunitate β, care-i creşte procesivitatea (abilitatea de a adăuga nucleotide continuu, fără să se disocieze de catena în creştere - vezi mai departe). Pentru catena „lagging" esenţială este viteza reacţiei de polimerizare şi nu procesivitatea.

Modelul propus, a cărei esenţă este replicarea simultană a celor două catene în şi pe direcţia bifurcaţiei de replicare pare un model valid.

De remarcat un avantaj important al acestei modalităţi de replicare: proximitatea situsurilor de terminare şi începere a două fragmente Okazaki ce se succed permite transferul concertat şi rapid al dispozitivului de replicare de la un primer la altul.

Fidelitatea procesului de replicare la procariote. Replicarea ADN, utilizând un aparat enzimatic extrem de elaborat, reuşeşte să asigure, prin înalta sa fidelitate, menţinerea capitalului genetic al speciei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Crearea unei catene noi, perfect complementară cu catena matriţă, se realizează atât prin respectarea principiului complementarităţii bazelor cât şi prin activitatea de autocontrol a ADN polimerazei III. Aceasta, pe lângă activitate polimerazică, prezintă şi o importantă activitate de corectare a unor erori, rezultat al atributelor enumerate anterior. De subliniat că ADN-polimeraza III stabileşte o legătură fosfat diesterică între capătul 3'–OH al catenei în creştere şi nucleotidul următor, numai dacă la capătul 3'–OH se găseşte un nucleotid corect împerecheat cu catena matriţă. Enzima are calitatea de a descoperi o eventuală eroare de împerechere matriţă-dezoxiribonucleotidul impropriu (încorporat la capătul 3'–OH al catenei în creştere) şi de a selecta pe cel adecvat. O asemenea situaţie poate să decurgă din apariţia tranzitorie a unor forme tautomere rare ale bazelor azotate (frecvenţa este de 10^{-4} – 10^{-5}). Astfel, citozina în formă imino, şi nu amino, se împerechează cu adenina şi nu, firesc, cu guanina. Această împerechere greşită este numai temporară, citozina revine la forma amino, uzuală, care nu se poate împerechea cu adenina; situaţia este sesizată de ADN polimerază, care nu mai continuă elongarea catenei având la capătul 3'–OH un nucleotid neîmperecheat. Prin activitate exonucleazică 3'→5', enzima exclude citozina, reluând elongarea catenei. În ipoteza unor erori repetate, ea îşi continuă activitatea exonucleazică până când găseşte capătul 3'–OH adecvat (împerecheat cu matriţa). Această activitate de supercontrol a ADN polimerazei III elimină erori ce s-ar fi comis dacă singurul mecanism de control ar fi fost respectarea principiului complementarităţii bazelor. Într-adevăr, dacă ADN polimeraza III n-ar fi fost înzestrată cu activitate de corector, perechea adenină-citozină s-ar fi menţinut în ADN nou sintetizat, generând o mutaţie.

Incapacitatea ADN polimerazei III de a iniţia catene polinucleotidice, respectiv necesitatea unui primer, nu este un handicap al enzimei ci o necesitate impusă de exigenţele procesului de replicare; ADN polimeraza III poate să excludă un nucleotid impostor numai dacă acesta se află la capătul 3' al unui lanţ polinucleotidic în creştere, ceea ce ar permite o iniţiere defectuoasă.

Soluţia pare a fi într-adevăr o iniţiere mai aproximativă, prin sinteza unui ARN primer, sub acţiunea unei ARN polimeraze lipsită de activitate de corector, şi excluderea ulterioară a acestuia, care va fi înlocuit cu fragmentul de ADN corespunzător.

Însăşi alegerea unui sens unic al replicării, şi anume cel cu direcţia 5'→3', contribuie la asigurarea acurateţii procesului, permiţând ADN polimerazei să-şi exercite acţiunea de autocontrol şi corectare a erorilor. Dacă lanţul sintetizat ar avea direcţia 3'→5' şi la capătul 5' ar apare o greşeală de împerechere, excluderea dezoxiribonucletidului impropriu ar face imposibilă continuarea replicării în condiţiile date, de unde necesitatea păstrării lui, chiar cu preţul compromiterii fidelităţii, aproape absolute, a procesului.

Ca rezultat al funcţiei de corector a ADN polimerazei şi al imperativului complementarităţii bazelor, frecvenţa erorilor în procesul de replicare a ADN este de una la 10^6 – 10^7 perechi de nucleotide. Totuşi, frecvenţa erorilor în ADN al Escherichiei coli este de numai una la 10^9 perechi de nucleotide, graţie unui sistem enzimatic ce acţionează post-replicativ (vezi mai departe).

Pe lângă activitatea de corector, ADN polimeraza III este o enzimă cu o capacitate catalitică excepţională; ea reuşeşte să adauge în cursul elongării aproximativ 60 000 de nucleotide pe minut. Viteza extrem de mare de polimerizare o face demnă de rolul pe care şi-l asumă în sinteza ADN.

Un număr mic de molecule de ADN polimerază III prezente într-o celulă bacteriană (aproximativ 10 molecule) reuşeşte să asigure o viteză adecvată sintezei discontinui a catenei „lagging", ceea ce presupune şi „reciclarea" lor rapidă între capătul unui fragment Okazaki şi capătul 3' al primerului anterior.

O a treia calitate a ADN polimerazei III, care o distinge, este procesivitatea, respectiv abilitatea de a adăuga nucleotide la catena în curs de sinteză fără să „coboare" de pe matriţă. ADN polimeraza III catalizează formarea a mii de legături fosfat diesterice fără să se disocieze de matriţă, ceea ce o consacră ca enzimă cu procesivitate remarcabilă, calitate extrem de importantă pentru sinteza catenei leading. Viteza foarte mare a reacţiei catalizate decurge, în speţă, din atributul de procesivitate al enzimei.

Acurateţea, procesivitatea şi eficienţa catalitică proprii ADN polimerazei III sunt calităţi pe care le reclamă rolul său în replicare.

În contrast, ADN polimeraza I are procesivitate redusă şi capacitate catalitică mică, în acord cu atribuţiile sale în replicare: excluderea primerilor şi umplerea golurilor rămase.

Replicarea la eucariote

În linii mari, replicarea la eucariote se desfăşoară după modelul descris, cu particularităţi derivând din organizarea genomului eucariot.

Ca şi la procariote, s-au identificat mai multe tipuri de ADN polimeraze şi anume: α, β, γ, δ.

ADN polimeraza α este implicată în replicarea ADN nuclear. Ea este formată din patru subunităţi, având proprietăţi şi structuri similare în toate celulele eucariote. Cum procesivitatea acestei enzime este relativ mică şi una dintre subunităţi manifestă acţiune primazică, se suspectează că ea este responsabilă de sinteza catenei „lagging".

ADN polimeraza δ este un dimer asociat cu o proteină – antigenul nuclear din celulele proliferante; această proteină, prezentă în cantităţi mari în nucleul acestor celule, stimulează ADN polimeraza δ, crescându-i procesivitatea.

Se consideră că ADN polimeraza δ răspunde de sinteza catenei „leading". Ea manifestă acţiune 3'$\rightarrow$5' exonucleazică.

ADN polimeraza β este implicată numai în repararea ADN, nu şi în replicarea acestuia; manifestă acţiune 5'$\rightarrow$3' exonucleazică.

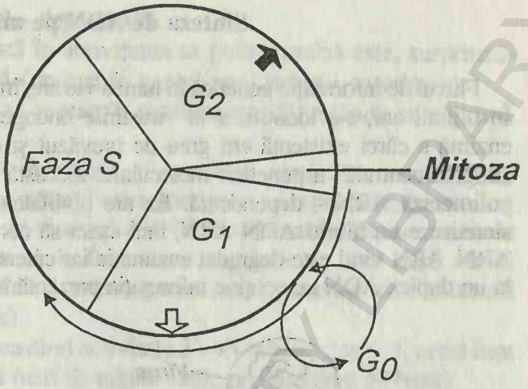
ADN polimeraza γ este implicată în replicarea ADN mitocondrial.

Polimerazele nu manifestă, în general, acţiune 3'$\rightarrow$5' exonucleazică, ceea ce sugerează existenţa unor mecanisme de asigurare a fidelităţii diferite faţă de cele ale procariotelor; se admite existenţa unor exonucleaze ca entităţi în sine.

Existenţa ADN ligazelor şi izolarea fragmentelor Okazaki pledează pentru discontinuitatea replicării (ca şi în cazul procariotelor).

Datorită mărimii moleculei ADN eucariot, cât şi deplasării relativ lente a bifurcaţiei de replicare (aproximativ 3000 baze/minut, fată de 16 000 la procariote), rezultat al organizării superioare a genomului, pe o moleculă de ADN există mai multe origini de replicare, separate prin 3.10^4 – 3.10^5 perechi de baze. În aceste origini multiple de replicare se organizează bifurcaţii de replicare (aproximativ 100 pe fiecare cromozom) ce se deplasează bidirecţional pe cromozomul eucariot în curs de replicare.

Fig. IV.21 - Fazele ciclului celular



Fidelitatea replicării este la eucariote de ordinul 10^{-9}, rezultat, probabil, al însăşi naturii cromozomului eucariot şi al acţiunii unor exonucleaze 3'→5' care secondează ADN polimeraza.

Biosinteza ADN are loc la mamifere în faza S, de sinteză, a ciclului celular, fază separată de faza mitotică prin perioadele de gol sintetic, G_1 şi G_2 (Fig. IV.21). În cursul acestei faze, ADN nuclear este replicat în întregime şi o singură dată per ciclu celular. Respectarea acestui imperativ este posibilă graţie unor procese de metilare care marchează covalent molecula ce a trecut prin experienţa replicării. Marcarea constă într-o metilare, în general a citozinei, la 5-metil-citozină, efectuată de ADN metilaze care folosesc ca donator de grupare metil SAM (S-adenozil metionina).

Gradul de metilare a citozinei este extrem de variabil, de la 3-5% pentru regnul animal, la 33 % pentru cel vegetal (virusurile animale se sustrag, în general, metilării).

La eucariote secvenţa recunoscută de către metilaze este:

5' - CG - 3'
3' - GC - 5'

metilarea decurgând pe ambele catene.

În eucariotele superioare un număr restrâns de celule se divid activ; cele mai multe sunt reţinute, după mitoză, în faza G_o, de nondiviziune (resting phase).

Decizia intrării din faza G_o în faza G_1 şi apoi în faza S, urmată de mitoză, este luată de proteine cu activitate kinazică (variabile cu specia) activate prin interacţiunea cu diverse cicline – proteine a căror concentraţie creşte sau scade dramatic în cursul ciclului celular.

Celulele tumorale ştiu să evite faza G_o a ciclului celular.

Ritmul sintezei de histone este cel al sintezei ADN, graţie copiilor multiple ale genelor ce specifică histonele (40 de seturi, fiecare conţinând genele corespunzătoare celor 5 tipuri de histone). În faza S cantitatea de ADN şi histone se dublează.

Durata fazei S variază cu specia; la mamifere este de aproximativ 8 ore.

Dacă ar exista o singură bifurcaţie de replicare care se deplasează cu o viteză de 50 nucleotide/secundă pe un cromozom conţinând aproximativ 150 milioane de nucleotide, ar fi necesare aproximativ 800 de ore – de unde necesitatea funcţionării sincrone a peste 100 de bifurcaţii de replicare per cromozom.

Diferite regiuni ale fiecărui cromozom sunt replicate în momente diferite ale fazei S, dar invariabil în aceeaşi secvenţă.

Controlul replicării şi diviziunii celulare ridică probleme numeroase, la care s-a răspuns, cel mult, parţial.

Sinteza de ADN pe matriţă de ARN

Fluxul de informaţie genetică în lumea vie are, în general, sensul ADN → ARN → Proteine. În ultimii ani, s-a identificat în virusurile oncogene conţinând ca material genetic ARN o enzimă a cărei existenţă era greu de prevăzut şi care a completat conceptul exprimat prin „dogma centrală" a geneticii moleculare. Această enzimă, revers transcriptaza, este o ADN polimerază ARN - dependentă. Ea are abilitatea ca, o dată pătrunsă in celula gazdă, să sintetizeze un hibrid ADN-ARN, mai exact să construiască o catenă de ADN pe matriţă de ARN. ARN viral este degradat enzimatic iar catena ADN rămasă se autoreplică dând naştere la un duplex ADN ce conţine informaţia prezentă în ARN viral (Fig. IV.22).

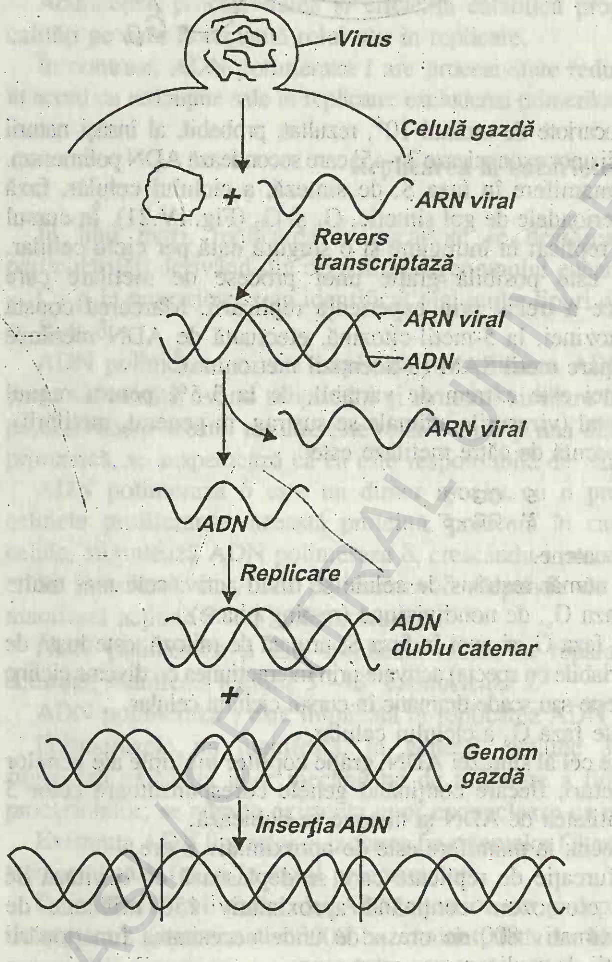


Fig. IV.22 - Replicarea ADN pe matriţă de ARN sub acţiunea ADN polimerazei - ARN dependentă (revers transcriptaza)

Ambele procese sunt catalizate de către revers transcriptaza în virtutea a două activităţi enzimatice adiţionale de care dispune:

1) activitate ribonucleazică, ce-i permite să hidrolizeze ARN din hibridul ARN/ADN (de unde şi desemnarea sa ca ribonuclează H);

2) activitate ADN polimerazică ADN - dependentă.

Primerul folosit de revers transcriptază în activitatea sa polimerazică este, surprinzător, un ARN_t înglobat în particula virală (preluat în cursul unei infecţii anterioare).

ADN rezultat prin revers transcriere se inseră în genomul gazdă putându-se exprima în proteine, într-o anumită conjunctură.

Cum numeroase virusuri ARN sunt oncogene şi genomul viral este moştenit, se consideră că fiecare subiect uman este purtătorul unei oncogene neexprimate, ca rezultat al pătrunderii în organism a unor astfel de virusuri ARN (retrovirusuri), într-un moment al evoluţiei. Dacă apare o condiţie care să le favorizeze exprimarea, deci dacă vor fi transcrise şi traduse, celula se malignizează prin acţiunea unor proteine ce realizează transformarea neoplazică (adesea kinaze).

Revers transcriptaza comite greşeli, neavând activitate 3'→5' exonucleazică; acest fapt ar constitui una dintre explicaţiile varietăţii mari de tulpini virale producătoare de boală.

Un retrovirus, prin excelenţă versatil,virusul imunodeficienţei umane (HIV) este răspunzător de sindromul imunodeficienţei dobândite (SIDA).

Acest virus are un design comparabil cu al celorlalte retrovirusuri, conţinând obligatoriu genele pol, env şi gag. Acestea specifică revers transcriptaza şi o enzimă de integrare în genomul gazdă (pol) cât şi proteine necesare asamblării particulei virale (gag, env) în cursul multiplicării. Integrarea în genomul gazdă presupune, pe lângă o integrază, secvenţe nucleotidice specifice la ambele capete (Long Terminal Repeats).

Virusul imunodeficienţei dobândite dispune de multe alte gene care, prin „splicing" alternativ, produc un număr impresionant de proteine benefice lui.

Versatilitatea acestui virus derivă, în speţă, din lipsa de acurateţe a revers transcriptazei, având ca rezultat un număr mare de mutaţii, deci de variante HIV, şi o eficienţă redusă a tratamentelor.

Descoperirea revers transcriptazei, pe lângă semnificaţia ei teoretică, are şi o importantă latură practică rezultată din faptul că, deşi preferă propriul ARN (viral), enzima poate utiliza ca matriţă orice ARN pe care construieşte un ADN complementar (ADN_c). Apare astfel posibilitatea obţinerii unor gene sintetice (ADN_c), prin utilizarea unor ARN mesageri, relativ uşor de izolat, gene care, prin tehnicile ingineriei genetice, pot produce mari cantităţi din proteina codificată.

IV.4. ACIZII RIBONUCLEICI

IV. 4.1. TIPURI DE ARN

Sunt produşi macromoleculari care iau naştere prin condensarea ribonucleotidelor. Ribonucleotidele ce alcătuiesc molecula de ARN stabilesc legături fosfat diesterice între guparea OH din poziţia 3' a unui nucleotid şi gruparea OH din poziţia 5' a nucleotidului succesiv (Fig. IV.23).

Din punct de vedere al compoziţiei în baze, ARN conţine, ca şi ADN, guanina, citozina şi adenina, dar, spre deosebire de acesta, cea de-a patra bază nu este timina, ci uracilul. Pe lângă aceste baze, ARN conţine şi baze aşa-zise „minore", rezultate prin metilări, tiolări ale bazelor „majore".

Componenta glucidică din structura ARN este riboza şi nu dezoxiriboza.

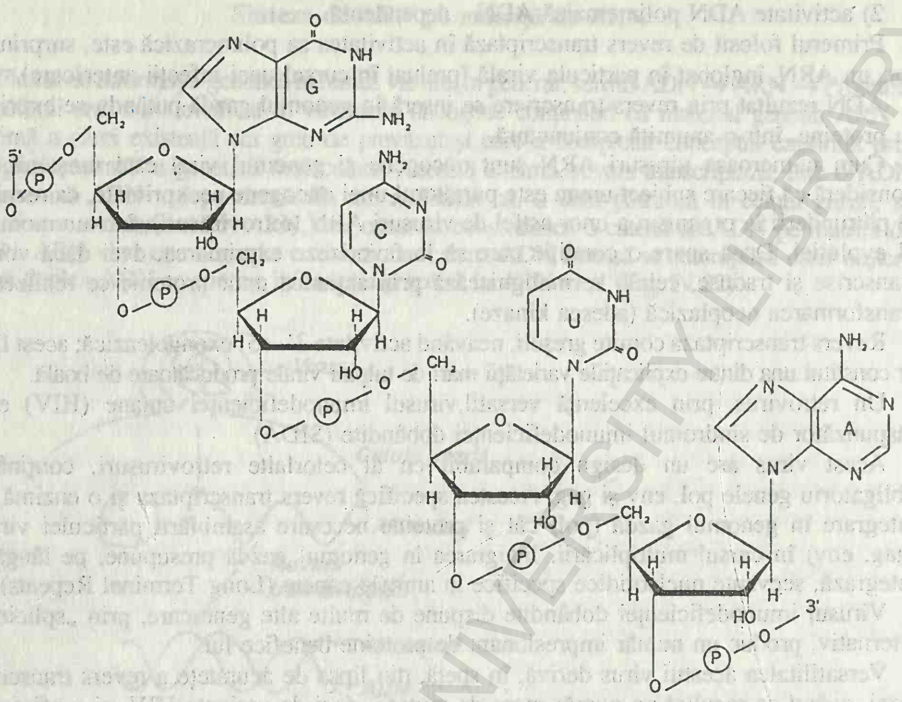


Fig. IV.23 - Structura covalentă a ARN

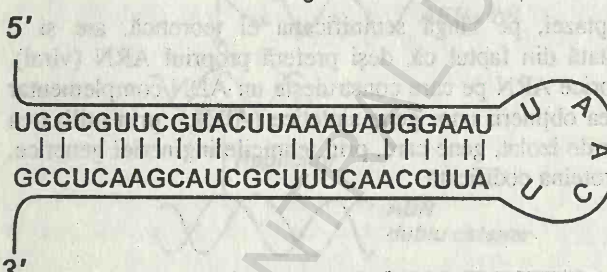


Fig. IV.24 - Structura ARN monocatenar conţinând porţiuni cu baze complementare asociate prin legături de hidrogen şi porţiuni cu baze necomplementare

Conţinutul în adenină este diferit de cel în uracil şi nici cel de guanină nu este egal cu cel de citozină. O structură dublu catenară complementară este exclusă pentru ARN. Moleculele de ARN sunt monocatene, dar, pe anumite porţiuni, acolo unde o permite complementaritatea bazelor se organizează în structuri dublu helicoidale. Porţiunile de baze necomplementare sunt expulzate ca bucle în afara zonelor de dublu helix dând moleculei aspectul de „ac de păr“ (Fig. IV.24).

Cantitatea de ARN, spre deosebire de cea de ADN, variază de la o celulă la alta şi chiar în cadrul aceleiaşi celule, în funcţie de intensitatea procesului de biosinteză a proteinelor la momentul dat.

După rolul ce le revine în procesul de biosinteză a proteinelor ARN pot fi:

- ARN mesager (ARN_m)
- ARN de transfer sau solubil (ARN_t)
- ARN ribozomal (ARN_r)
- ARN nuclear scurt (de mică dimensiune)

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ARN mesager (ARN_m)

Ţinând seama de faptul că molecula de ADN se găseşte în nucleu, în timp ce biosinteza proteinelor se desfăşoară în citoplasmă, Jacob şi Monod au postulat existenţa unui intermediar care „aduce“ mesajul genetic din nucleu în citoplasmă. Acest intermediar s-a dovedit a fi o moleculă de ARN, denumită ulterior ARN mesager.

Moleculele de ARN_m sunt molecule monocatenare liniare, de lungime variabilă.

ARN_m este sintetizat în nucleu pe matriţă de ADN. O genă structurală este transcrisă, în sensul complementarităţii bazelor (A corespunde la U, iar G la C), obţinându-se o moleculă de ARN_m a cărei compoziţie în baze reflectă compoziţia în baze a genei transcrise.

ARN_m nuclear iese în citoplasmă (la eucariote după „prelucrarea“ sa şi formarea unui ARN_m matur), unde va servi ca matriţă (template) pentru sinteza unui polipeptid cu secvenţă specifică de aminoacizi. Fiecare aminoacid este codificat de către o secvenţă de trei nucleotide, denumită codon. Capătul 5' al ARN_m conţine o secvenţă care nu este tradusă în proteine, denumită secvenţa „leader“ (la procariote, „include secvenţa Shine Dalgarno“); capătul 3' conţine şi el o regiune netradusă, cunoscută ca secvenţă „trailer“.

La procariote, o moleculă de ARN_m poate să conţină informaţia pentru sinteza unui singur polipeptid (ARN_m monogenic sau monocistronic) sau a mai multor polipeptide implicate în aceeaşi cale metabolică (ARN_m poligenic sau policistronic). Cistronii sunt separaţi prin „regiuni intercistronice“ sau „spaţiatori“.

La procariote, între gena transcrisă, ARN_m şi proteina specificată de genă există o relaţie de colinearitate, succesiunea tripletelor nucleotidice într-o genă corespunzând exact celei a aminoacizilor în proteina codificată.

La eucariote, ARN_m rezultat al transcrierii este monogenic şi, cel mai adesea, cu mult mai lung decât ARN_m citoplasmatic. Şi la eucariote, ca şi la procariote, la capetele 5' şi 3' se găsesc regiuni netraductibile. Genele care codifică proteine sunt, în general, întrerupte de secvenţe de ADN necodificatoare, introni (intervening sequences). Secvenţele codificatoare, separate prin introni, poartă numele de exoni (expressed regions). Dogma colinearităţii genă-proteină, valabilă la procariote, este încălcată la eucariote, la care continuitatea informaţiei genetice este desfiinţată. Gena nu mai este corespondentul structural al ARN_m, subiect al traducerii, fiind cu mult mai lungă decât ar fi necesar pentru codificarea unui anumit polipeptid. ARN_m rezultaţi prin transcriere, respectiv ARN_m transcripte primare sau ARN_m precursori, sunt supuşi unor prelucrări diverse având ca rezultat obţinerea unor ARN_m de dimensiuni diferite, funcţie de stadiul de prelucrare la care se găseşte fiecare exemplar, reuniţi sub numele de ARN nuclear heterogen; un ARN_m produs final al procesului de prelucrare este un ARN_m matur.

Prelucrarea ARN_m nuclear generează unul sau, uneori, mai mulţi ARN_m maturi, care vor servi ca matriţe pentru sinteza unuia sau a mai multor polipeptide cu secvenţe specifice de aminoacizi.

Timpul de supravieţuire a ARN_m în celulă este variabil. ARN_m bacterian are o viaţă foarte scurtă (2–3 minute); după ce serveşte la sinteza câtorva zeci de exemplare din proteina pe care o specifică, este degradat de nucleaze.

La eucariote, ARN_m are o viaţă de ordinul orelor; această diferenţă este uşor de înţeles ţinând seama de fluctuaţiile mari de mediu la care o bacterie se obstinează să se adapteze continuu.

Moleculele de ARN_t sunt molecule mici (70–90 nucleotide), monocatenare, în care procentul de baze complementare este deosebit de mare faţă de celelalte specii de ARN. Raportul A+G/U+C din ARN_t este apropiat de 1.

ARN_t nuclear, nu şi cel mitocondrial, prezintă o conformaţie în „foaie de trifoi“, având 4 zone de perechi complementare şi 3 necomplementare, expulzate cu bucle (Fig. IV.25).

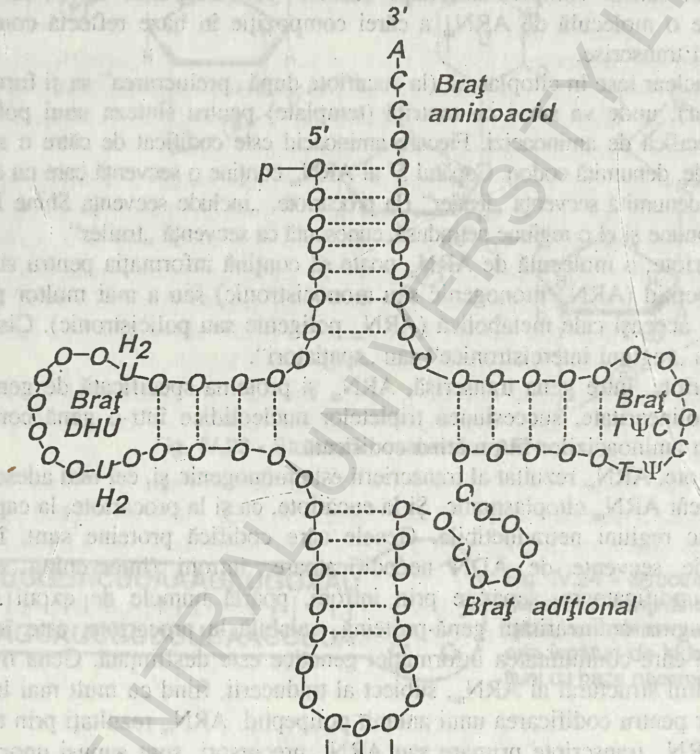
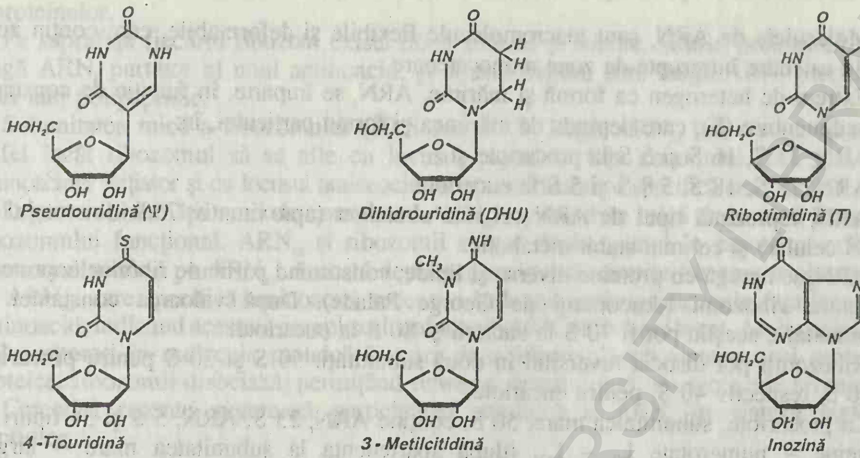


Fig. IV.25 - Structura tridimensională a ARN_t

La capătul 5' terminal, cei mai mulţi ARN_t au restul acid guanilic, iar la capătul 3', toţi au secvenţa nucleotidică CCA. La capătul buclei inferioare se găseşte aşa-numita porţiune anticodon, care variază cu natura ARN_t. Şi alte secvenţe nucleotidice sunt importante în procesele de recunoaştere; de exemplu, în braţul DHU există o secvenţă nucleotidică care recunoaşte şi se leagă la aminoacil-ARN_t-sintetaza, enzimă care „încarcă“ ARN_t cu un aminoacid specific, activat. În braţul TΨC, o anumită secvenţă nucleotidică asigură legarea la ribozom a complexului aminoacil - ARN_t.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toate tipurile de ARN_t au un procent neobişnuit de mare de baze minore:



În procesul de biosinteză a proteinelor, ARN_t are de îndeplinit două funcţii:

1. Transportul aminoacizilor activaţi în faza solubilă, la ribozomi, sub formă de complexe aminoacil - ARN_t. Fiecăruia dintre cei 20 de aminoacizi care intră în structura proteinelor îi corespunde cel puţin un ARN_t specific. Există, cel puţin 20 de tipuri de ARN_t. În general, există mai mulţi ARN_t specifici pentru un aminoacid - ARN_t izoacceptori - fapt explicabil prin caracterul degenerat al codului genetic (un aminoacid poate fi specificat de mai mulţi codoni).

Legarea aminoacidului se face la reziduul adenilic din secvenţa CCA şi constă în stabilirea unei legături macroergice între –OH din 3' al adeninei şi restul acil al aminoacidului (vezi sinteza proteinelor).

2. Adaptarea aminoacidului transportat în dreptul codonului de pe ARN_m care-l specifică. Această racordare a aminoacidului este posibilă prin recunoaşterea codon-anticodon. Porţiunea anticodon din ARN_t este complementară succesiunii de nucleotide din ARN_m ce codifică aminoacidul transportat de ARN_t respectiv şi ca atare cele două regiuni pot stabili legături de hidrogen (Fig. IV.26). ARN_t este relativ stabil la procariote şi mai puţin stabil la eucariote.

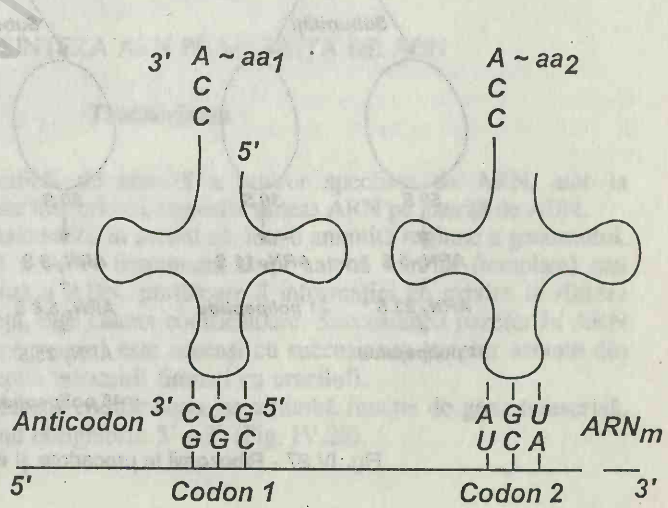


Fig. IV.26 - Recunoaşterea codon - anticodon

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ARN ribozomal (ARN_r)

Moleculele de ARN_r sunt macromolecule flexibile şi deformabile, care conţin zone dublu catenare întrerupte de zone monocatenare.

Extrem de heterogen ca formă şi mărime, ARN_t se împarte, în funcţie de constanta de sedimentare (S), care depinde de mărimea şi forma particulei, în:

ARN_r 23 S, 16 S şi 5 S la procariote şi

ARN_r 28 S, 18 S, 5,8 S şi 5 S la eucariote.

ARN_r reprezintă tipul de ARN cel mai abundent (aproximativ 75% din totalul de ARN celular) şi cel mai stabil metabolic.

ARN_r se agregă cu proteine diverse şi lipide, constituind particule ribonucleoproteice denumite ribozomi (descoperiţi de George Palade). După valoarea constantei de sedimentare, aceştia pot fi 70 S la bacterii şi 80 S la eucariote.

Ribozomii pot disocia reversibil în două subunităţi: 50 S şi 30 S pentru procariote şi 60 S, respectiv 40 S, pentru eucariote.

La procariote, subunitatea mare, 50 S, conţine ARN_r 23 S, ARN_r 5 S şi 34 tipuri de proteine – numerotate L_1 – L_{34} (după apartenenţa la subunitatea mare – large). Subunitatea mică, 30 S, conţine ARN_r 16 S şi 21 tipuri de proteine – numerotate S_1 – S_{21} (după apartenenţa la subunitatea mică - small) (Fig. IV.27). Proteinele ribozomale au roluri bine stabilite, nu în întregime descifrate, decurgând fie din capacitatea catalitică (peptidil transferaze, GTP-aze), fie din abilitatea de a „construi" arhitecturi stereospecifice, esenţiale în recunoaşterea şi legarea diverselor tipuri de ARN implicate în biosinteza proteinelor (ARN_m, aminoacil-ARN_t).

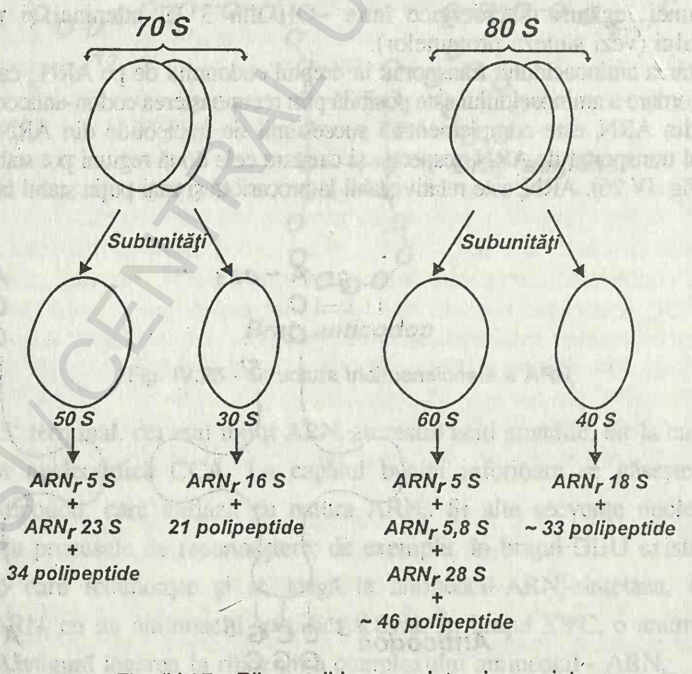


Fig. IV.27 - Ribozomii la procariote şi eucariote

Ribozomii constituie sediul biosintezei proteinelor. Aceste unităţi mecano-chimice permit conlucrarea ARN_m, ARN_t şi ARN_r în vederea desfăşurării procesului de sinteză a proteinelor.

Pe suprafaţa fiecărui ribozom există două situsuri şi anume: situsul aminoacid, care leagă ARN_t purtător al unui aminoacid, şi situsul peptid, care leagă ARN_t purtător al unui lanţ polipeptidic.

Subunitatea mică a ribozomului (30 S sau 40 S) leagă ARN_m într-un loc specific, astfel încât ribozomul să se afle cu locusul peptid în faţa codonului care specifică aminoacidul iniţiator şi cu locusul aminoacid în faţa codonului ce specifică aminoacidul 2.

Legarea subunităţii mari de complexul ARN_m - subunitate mică determină formarea ribozomului funcţional. ARN_m şi ribozomii se pot deplasa unul în raport cu celălalt, ribozomul glisând pe ARN_m. Această deplasare reciprocă permite trecerea tripletelor de pe ARN_m, care specifică aminoacizi succesivi în lanţul polipeptidic, prin faţa locusului aminoacid, indicând acestuia complexul aminoacil-ARN_t ce trebuie legat. Aminoacizii vor fi încorporaţi în molecula proteică în curs de edificare. După sinteza unei molecule proteice, ribozomii disociază, permiţând reluarea sintezei unei noi molecule proteice.

Cercetări recente sugerează participarea catalitică a ARN_r în sinteza legăturii peptidice.

ARN nuclear de mici dimensiuni

O a patra categorie de ARN întâlnită la eucariote, despre care nu se ştiu încă multe lucruri certe, este reprezentată de ARN de mici dimensiuni - scurt (small nuclear RNA).

Acest tip de ARN este constituit din aproximativ 100 de nucleotide şi conţine un procent mare de uridină. Există sub forma mai multor specii moleculare notate U_1, U_2 etc.

Se găseşte cu precădere în nucleu, asociat cu proteine, generând ribonucleoproteine desemnate după tipul de ARN „scurt": $snRNPU_1$, $snRNPU_2$ etc. (small nuclear ribonucleoproteins = snurps).

snRNP(U_1, U_2, U_4, U_5 şi U_6) intervin în excizia intronilor din ARN_m transcript primar, $snRNPU_3$ sunt implicate în prelucrarea ARN_t transcript primar iar $snRNPU_7$ pare responsabilă de formarea capătului 5' al ARN_m precursor pentru histone.

IV.4.2. BIOSINTEZA ARN PE MATRIŢĂ DE ADN

Transcrierea

Modalitatea majoră, specifică, de sinteză a tuturor speciilor de ARN, atât la procariote cât şi la eucariote, este transcrierea, respectiv sinteza ARN pe matriţă de ADN.

În vivo, transcrierea este asimetrică în sensul că, într-o anumită regiune a genomului, se copiază o singură catenă a ADN desemnată drept catenă matriţă (template) sau necodificatoare, cealaltă catenă a ADN, purtătoare a informaţiei cu privire la sinteza unui lanţ polipeptidic, în speţă, este catena codificatoare. Succesiunea bazelor în ARN nou sintetizat (ARN transcript primar) este aceeaşi cu succesiunea bazelor azotate din catena codificatoare (cu excepţia înlocuirii timinei cu uracilul).

Relaţia catenă template - catenă codificatoare se schimbă funcţie de gena transcrisă, sensul sintezei ARN rămânând obligatoriu 5'→3' (Fig. IV.28).

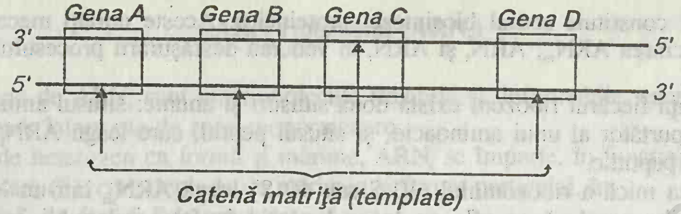


Fig. IV.28. Transcrierea asimetrică a ADN

Biosinteza ARN, spre deosebire de replicare, proces care angajează simultan întregul cromozom, vizează numai anumite porţiuni de ADN, acelea care codifică proteinele de care celula are nevoie la un moment dat şi implicit ARN_t şi ARN_r necesari.

Biosinteza ARN, moment crucial în transferul de informaţie de la ADN la proteine, presupune, în esenţă, prezenţa ADN dublu helicoidal, a celor patru ribonucleozid-trifosfaţi (ATP, GTP, CTP, UTP) şi a ARN polimerazei ADN-dependentă. Enzima construieşte o catenă de ARN, complementară cu catena ADN matriţă pentru o anumită genă, având polaritate 5'→3'. Ca şi ADN polimeraza, ARN polimeraza conţine zinc şi necesită prezenţa în mediu a ionilor de magneziu sau mangan (Mn^{2+}).

Transcrierea la procariote

Spre deosebire de eucariote, care folosesc ARN polimeraze diferite în funcţie de tipul de ARN sintetizat, la procariote există o singură ARN polimerază pentru toate tipurile de ARN. Ea este constituită din patru subunităţi: două de tip α, una de tip β şi una de tip β' ($\alpha_2\beta\beta'$). La această „enzimă-miez", importantă în procesul de elongare, se asociază, tranzitoriu, subunitatea sigma -σ, importantă în iniţierea transcrierii. Pentamerul $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ constituie holoenzima. În absenţa subunităţii σ ARN polimeraza se leagă nespecific la ADN.

Din punct de vedere chimic, reacţia globală catalizată de ARN polimerază poate fi reprezentată:

$$(ARN)_n + NTP \longrightarrow (ARN)_{n+1} + PP$$

Ca şi în cazul acţiunii ADN polimerazei, reacţia de formare a legăturii fosfat diesterice constă în atacul nucleofil al grupării 3' hidroxi libere din poliribonucleotidul în creştere asupra grupării α-fosfat din ribonucleozid trifosfatul următor impus de matriţă.

Reacţia devine termodinamic favorabilă prin acţiunea pirofosfatazei ($PP \rightarrow 2P_a$).

Spre deosebire de ADN polimeraza III, ARN polimerazele sunt apte să iniţieze sinteza catenelor poliribonucleotidice, fapt corelat, cu lipsa calităţii de corector, tolerată de însăşi funcţia ARN.

Sinteza ARN, atât la procariote cât şi la eucariote, decurge după un model similar implicând ca etape: I. iniţierea transcrierii, II. elongarea catenei poliribonucleotidice III. terminarea transcrierii.

În procesul transcrierii esenţială este recunoaşterea pe molecula de ADN a unor semnale de iniţiere şi de terminare a transcrierii care să indice începutul şi sfârşitul fragmentelor de ADN ce vor fi transcrise (unităţi de transcriere). Această sarcină, de extremă importanţă, şi-o asumă ARN polimerazele.

I. Inițierea transcrierii

Situsul de inițiere a transcrierii este semnalat de către o secvență specifică de nucleotide din molecula ADN, responsabilă de acuratețea procesului, care poartă numele de promotor (P) și care este recunoscut de ARN polimerază — holoenzima ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Subunități σ diferite orientează holoenzima către promotori diferiți asigurând specificitatea.

Secvența nucleotidelor în regiunea promotor, conservată în evoluție, a fost stabilită pentru un număr mare de gene bacteriene, fapt care a permis desemnarea unor secvențe consens, ca medie a structurii diferiților promotori.

Față de punctul de start al transcrierii, notat cu +1, care va dicta capătul 5' al transcriptului primar ARN, promotorii sunt situați în „amonte" și notați cu minus (secvențele în aval față de +1 sunt notate cu plus, tot prin convenție).

Toți promotorii bacterieni au două secvențe consens situate pe catena codificatoare : caseta - 10 (Pribnow): 5'TATAAT 3' și caseta – 35: 5'TTGACA 3'.

Se admite că variabilitatea secvențelor promotor este corelată cu eficiența cu care ARN polimeraza se leagă la acestea, respectiv cu amploarea exprimării genei.

Momentele inițierii pot fi sumarizate astfel:

1. subunitatea σ a holoenzimei recunoaște promotorul specific, în regiunea – 35, și se leagă la acesta printr-o legătură laxă; are loc formarea așa-zisului „complex închis" de inițiere;

2. Holoenzima „alunecă" de-a lungul ADN și, în jurul poziției – 10, bogată în acid timidilic și adenilic, deschide ("topește") dublul helix pe o porțiune de aproximativ 10 perechi de baze în virtutea activității sale de helicază; are loc formarea „complexului deschis" de inițiere;

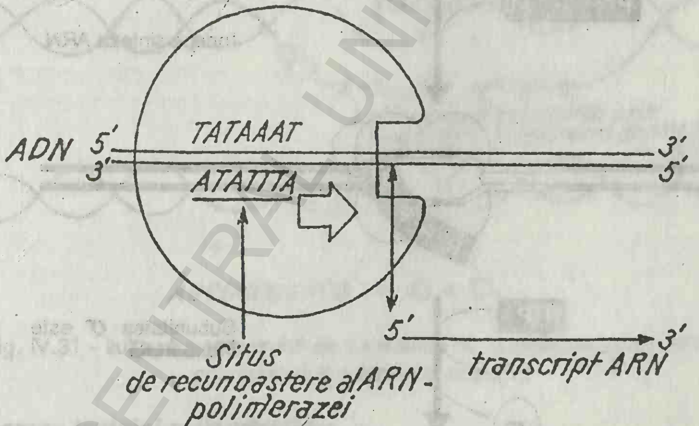


Fig. IV.29 - ARN polimeraza se află cu situsul catalitic în dreptul semnalului de inițiere a transcrierii

3. ARN polimeraza, prezentă cu situsul activ în dreptul semnalului de inițiere a transcrierii (Fig. IV.29), catalizează formarea primei legături fosfat diesterice între nucleotidul +1, aproape invariabil unul purinic, și nucleotidul +2.

Enzima, care conține pe subunitatea β un situs de legare a nucleotidului nou introdus și altul de legare a moleculei de ARN în curs de edificare, se deplasează în poziția +3 pe template și continuă sinteza. Subunitatea σ, care se disociază din complexul ARN polimerază –ADN–ARN după formarea primelor legături fosfat diesterice, se asociază unei alte molecule de ARN polimerază — miez — și începe o nouă rundă de transcriere (Fig. IV.30).

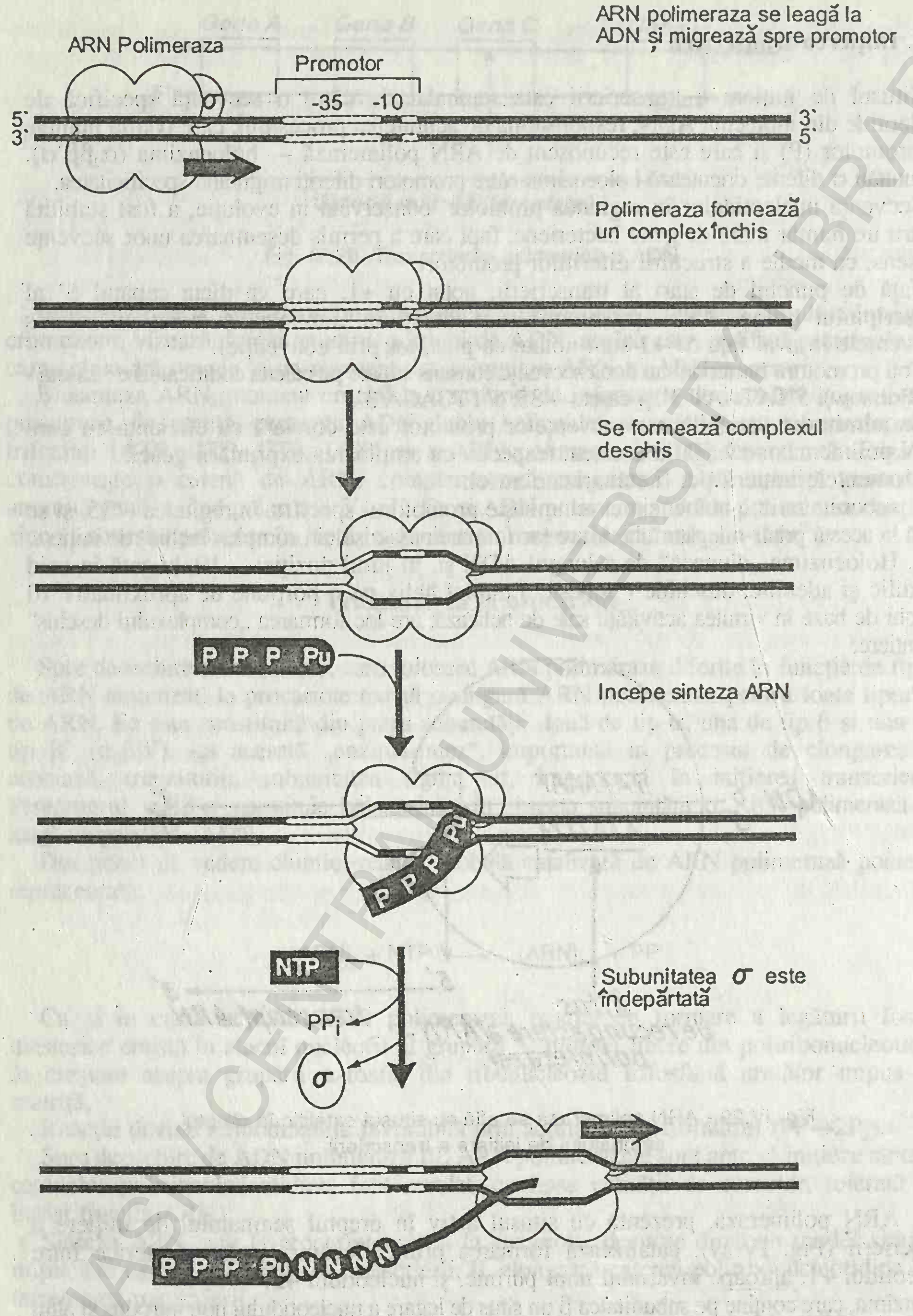


Fig. IV.30 - Momente în iniţierea transcrierii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

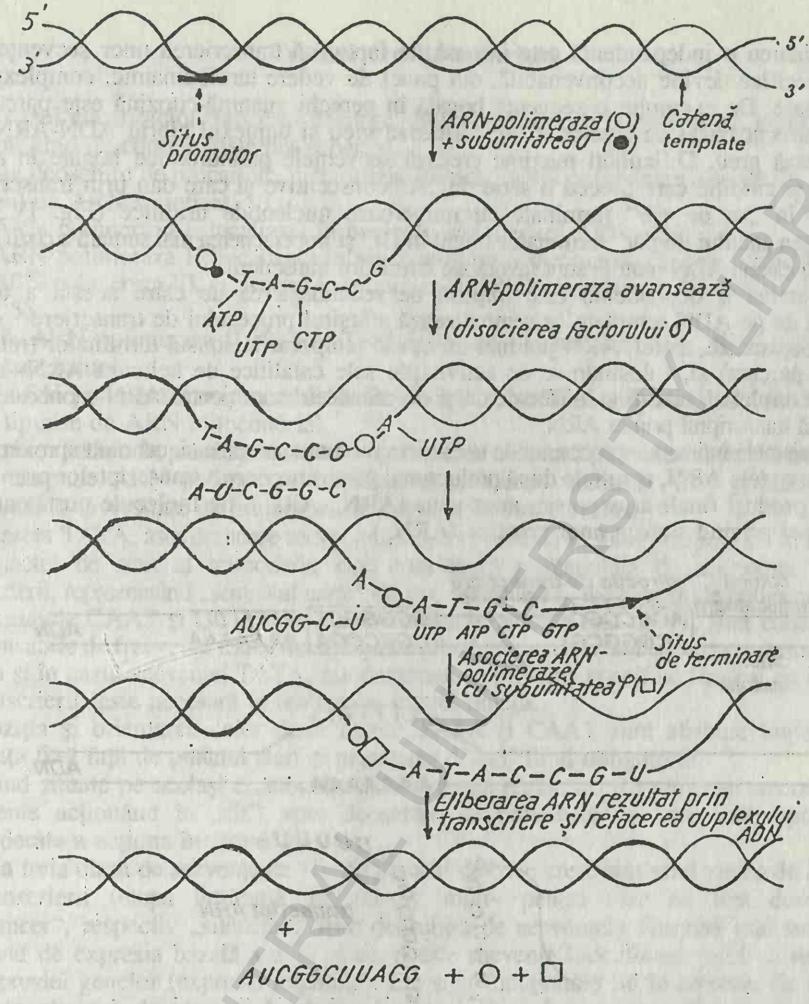


Fig. IV.31 - Ilustrarea procesului de transcriere cu sublinierea rolului ARN polimerazei şi a factorilor σ şi ρ

II. Elongarea lanţului polinucleotidic

La capătul 3' terminal al ARN în creştere se adaugă ribonucleotidele dictate de matriţă. Toate evenimentele transcrierii decurg în bucla de transcriere care cuprinde 12-17 perechi de baze ADN-ARN. Pe măsură ce molecula de ARN transcript primar se sintetizează, are loc disocierea sa din duplexul hibrid cu catena template, permiţându-se refacerea ADN duplex, asistată, ca şi desrăsucirea, de topoizomeraze, parte integrantă a complexului de transcriere.

Viteza de elongare nu este constantă, ea depinzând de secvenţele de ADN „citite" de ARN polimerază.

III. Terminarea transcrierii

Există cel puţin două modalităţi de terminare a transcrierii: rho (ρ) dependentă şi rho independentă, rho fiind un factor proteic reglator (Fig. IV.31).

Terminarea ρ independentă este impusă de faptul că transcrierea unor secvenţe de ADN specifice devine neconvenabilă, din punct de vedere termodinamic, complexului de elongare. De exemplu: o secvenţă bogată în perechi guanină-citozină este parcursă dificil întrucât bucla de transcriere se formează greu şi duplexul hibrid ADN-ARN se denaturează greu. Dificultăţi maxime creează secvenţele palindromice bogate în acid guanilic şi citidilic care preced o serie de „A" consecutive şi care dau prin transcriere structuri în „ac de păr" terminate cu numeroase nucleotide uridilice (Fig. IV.32). Stabilitatea „acului de păr" terminator bogat în GC şi împerecherea mai sumară a cozii sale poli-U cu catena ADN matriţă sunt favorabile terminării transcrierii.

Terminarea ρ dependentă este impusă de recunoaşterea de către acesta a unor secvenţe de pe ADN template ce semnalizează sfârşitul procesului de transcriere.

Rho depistează, astfel, ARN polimeraza oprită temporar la situsul terminator (relativ greu de parcurs) şi, folosindu-se de activităţile sale catalitice de helicază ARN-ADN (desface duplexul hibrid) şi ATP-ază, ca şi de afinitatea mare pentru ARN monocatenar, eliberează transcriptul primar ARN.

Mecanismele intime ale procesului de transcriere nu sunt cunoscute ci, cel mult aproximate.

Transcriptele ARN, rezultate după prelucrarea posttranscriere a transcriptelor primare, sunt fie produşi finali ai expresiei unor gene (ARN_r, ARN_t), fie molecule purtătoare a informaţiei privind sinteza unor proteine (ARN_m).

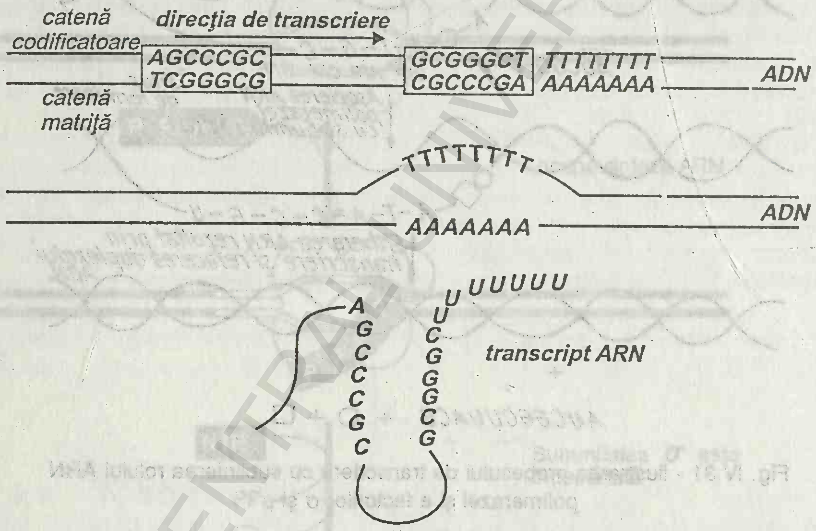
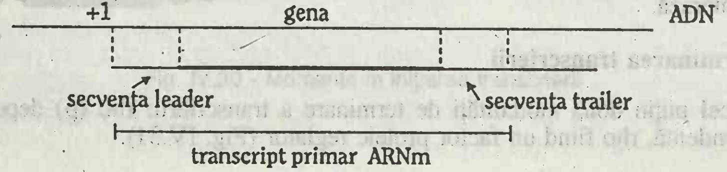


Fig. IV.32 - Structură în "ac de păr" favorabilă terminării transcrierii

De remarcat că transcriptul primar ARN_m procariot este mai lung decât însăşi gena de transcris. ARN polimeraza transcrie nu numai gena corespunzătoare unui anumit ARN_m ci şi două secvenţe suplimentare care o flanchează. ARN_m transcript primar va avea, ca urmare, la capătul 5' o secvenţă denumită „leader" iar la capătul 3' o secvenţă „trailer" care nu se exprimă în proteină:



BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul eucariotelor, procesul decurge similar transcrierii la procariote, comportând însă un grad de complexitate net superior.

Spre deosebire de procariote, eucariotele folosesc ARN polimeraze diferite, în funcţie de tipul de ARN sintetizat.

- ARN polimeraza I, localizată în nucleoli, sintetizează ARN_r 45S;
- ARN polimeraza II, localizată în nucleoplasmă, sintetizează, cu precădere, ARN_m;
- ARN polimeraza III, cu aceeaşi localizare ca şi ARN polimeraza II, sintetizează ARN_t şi ARN_r 5S.

Atât ARN polimeraza II cât şi ARN polimeraza III sintetizează şi ARN nuclear de mici dimensiuni.

O ARN polimerază mitocondrială, localizată în matrixul mitocondrial, sintetizează toate tipurile de ARN mitocondrial.

Fiecare dintre cele patru tipuri de ARN polimeraze utilizează promotori diferiţi între ei.

În timp ce ARN polimeraza I utilizează promotori identici, ARN polimeraza II utilizează o diversitate de promotori, având ca secvenţe-consens:

- caseta TATA, asemănătoare secvenţei Pribnow, centrată în jurul poziţiei -32, în amonte de punctul de start al transcrierii; este considerată responsabilă de acurateţea iniţierii transcrierii, reprezentând „semnalul unde" (începe transcrierea), recunoscut de polimerază;
- casetele CAAT şi GC, situate de asemenea în amonte faţă de +1, sunt considerate responsabile de frecvenţa transcrierii, reprezentând „semnalul când" (începe transcrierea).

Ca şi în cazul secvenţei TATA, interacţiunea cu proteine specifice (factori de iniţiere a transcrierii) este necesară în realizarea acestei funcţii.

Poziţia şi orientarea celor două casete TATA şi CAAT sunt atribute importante, distanţa fixă faţă de punctul start şi orientarea 5'→3' fiind obligatorie.

Fiind situate pe acelaşi cromozom ca şi gena de reglat, aceste secvenţe se consideră elemente acţionând în „cis", spre deosebire de proteinele cu care interacţionează, considerate a acţiona în „trans".

O a treia clasă de secvenţe de 10–20 perechi de baze cresc sau scad viteza de iniţiere a transcrierii (etapa limitantă de viteză), motiv pentru care au fost desemnate „enhancer", respectiv „silencer". Spre deosebire de secvenţele descrise mai sus, care răspund de expresia bazală a unor gene, aceste secvenţe îndeplinesc rolul de reglatori ai expresiei genelor (expresia reglabilă). Ele sunt funcţionale fie în amonte, fie în aval faţă de punctul de start şi la distanţe uneori chiar foarte mari faţă de promotori (obligatoriu însă în cis). Orientarea relativă faţă de gena a cărei transcriere o controlează poate fi atât 5'→3' cât şi 3'→5' (Fig. IV.33).

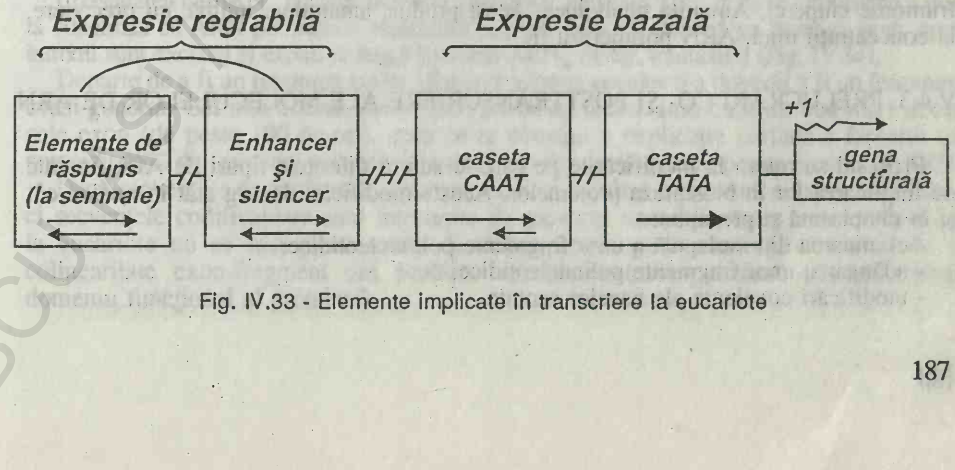


Fig. IV.33 - Elemente implicate în transcriere la eucariote

Funcţia acestor elemente de control se realizează ca urmare a interacţiunii cu factori proteici, respectiv factori de transcriere, având ca efect modificări conformaţionale în molecula de ADN; modificări ce pot fi favorabile sau defavorabile transcrierii.

Secvenţele enhancer sunt asociate cu gene care se exprimă selectiv în diverse ţesuturi, deci relaţia lor cu diferenţierea celulară este de admis.

Tot din clasa secvenţelor interesate în expresia genelor fac parte şi anumite elemente care mediază răspunsul la diferite semnale - motiv pentru care sunt numite „elemente de răspuns" (responsive elements) foarte asemănătoare cu enhancerii.

Sunt identificate „elemente de răspuns" la hormonii glucocorticoizi, tiroidieni şi alţi compuşi cu caracter puternic hidrofob, care pot traversa cu uşurinţă membrana celulară, legându-se, ulterior, la receptori specifici intracelulari. Complexul hormon-receptor traversează membrana nucleară şi schimbă proteina receptor cu un factor de transcriere având un domeniu de recunoaştere a elementului de răspuns hormonal specific. Toate genele care dispun de un element de răspuns hormonal, în speţă, îşi vor activa transcrierea (vezi stimularea transcrierii genelor ce specifică enzimele-cheie ale gluconeogenezei prin glucocorticoizi - hormoni hiperglicemianţi).

Factori de transcriere specifici, interacţionând cu „elemente de răspuns" la stresuri termice, chimice etc. activează transcrierea unui grup de gene având ca produşi proteine ce atenuează stresul: proteine de şoc termic, proteine care chelează metalele grele (ca de exemplu metalotioneina, proteină cu conţinut mare în grupări tiol), proteine care se opun stres-ului oxidativ al speciilor reactive de oxigen (superoxid dismutaza) etc.

O subliniere necesară la sfârşitul „odiseei" transcrierii: toate elementele bazale sau reglatorii au o caracteristică comună: interacţiunea cu proteine specifice.

Acţiunea ARN polimerazelor I şi III prezintă similitudini dar şi diferenţe majore faţă de acţiunea ARN polimerazei II, diferenţe doar consemnate, fără pătrunderea raţiunii lor.

Inhibitori ai transcrierii

Transcrierea ADN este suprimată de către unii compuşi exogeni, fie prin modificarea structurii ADN astfel încât acesta să nu mai poată servi ca matriţă în sinteza ARN, fie prin inhibarea ARN polimerazelor procariote sau eucariote.

Antibioticul actinomicina D, ca şi colorantul acridină, prin porţiunea lor plană, se insinuează între perechile de baze G≡C; această intercalare are ca rezultat distorsiunea moleculei de ADN, care nu mai poate servi ca matriţă pentru ARN polimeraze.

Dependenţa unui proces celular de sinteza ARN se „diagnostichează" in vitro prin inhibiţia acestuia de către actinomicină.

Rifampicina, un antibiotic extrem de activ în tratarea tuberculozei, se leagă la subunitatea β a ARN polimerazei-holoenzimă din procariote, prevenind iniţierea transcrierii. Ea nu inhibă ARN polimerazele eucariotelor.

Un inhibitor de temut al ARN polimerazelor din celulele animale este produsul unei frumoase ciuperci, Amanita phalloides. Acest produs, amanitina, inhibă, cu precădere, la concentraţii mici, ARN polimeraza II.

IV.4.3. PRELUCRĂRI CO- ŞI POSTTRANSCRIERE ALE MOLECULELOR DE ARN

Procesul se referă la modificările pe care le suferă diferitele tipuri de ARN înainte de implicarea lor în biosinteza proteinelor. Aceste modificări decurg atât în nucleu cât şi în citoplasmă şi presupun:

- eliminarea din moleculă a unor fragmente polinucleotidice;
- adăugarea unor fragmente polinucleotidice;
- modificări covalente ale bazelor azotate.

Modificarea majoră pe care o suferă transcriptele primare la eucariote constă în scurtarea acestora.

Cercetările ultimilor ani au arătat că moleculele de ARN (ARN_m, ARN_t, ARN_r, ARN nuclear „scurt"), rezultate prin transcrierea unor gene structurale, pot să ajungă la locul de sinteză a proteinelor cu mult mai scurte decât porţiunea din genom ce corespunde proteinei respective sau ARN_t, ARN_r. Constatarea a avut ca punct de plecare observaţia că fragmentul de ADN corespunzător ARN_m ce conţine informaţia privitoare la sinteza ovalbuminei este întrerupt de secvenţe de ADN ce nu se regăsesc în ARN_m citoplasmatic. Rezultă că secvenţele de baze care codifică ovalbumina sunt plasate discontinuu în genom.

Secvenţele nucleotidice din cuprinsul genei corespunzătoare ovalbuminei care nu se regăsesc în molecula de ARN_m citoplasmatic s-au denumit „introni", iar secvenţele nucleotidice transcriptibile şi traductibile, delimitate de introni, s-au denumit „exoni".

Lungimea totală a genei de ovalbumină corespunde la 7700 perechi de baze, în timp ce aceea a ARN_m citoplasmatic, la numai 1872. Dintre acestea 1158 perechi de baze codifică cei 386 aminoacizi ai proteinei, iar 64 de nucleotide de la capătul 5' şi 650 de la capătul 3' al ARN_m nu sunt traduse.

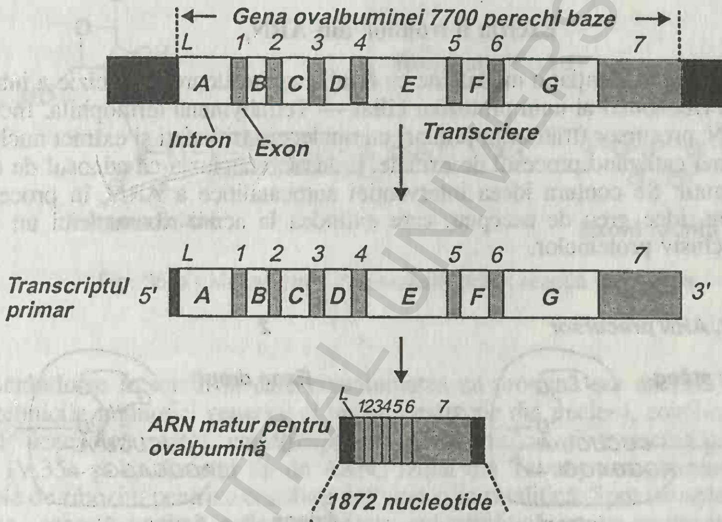


Fig. IV.34 - Transcrierea genei de ovalbumină, cu obţinerea transcriptului primar, urmată de excizia intronilor; ARN_m matur rezultat va servi ca matriţă pentru sinteza ovalbuminei

Constatarea că ARN_m nuclear este mai lung decât acelaşi ARN_m ajuns în citoplasmă a dus la concluzia că ARN polimeraza realizează o copie primară identică cu întreaga genă, apoi intronii sunt excizaţi şi exonii se leagă formând ARN_m matur, traductibil (Fig. IV.34).

Departe de a fi un fenomen izolat, discontinuitatea genelor s-a dovedit a fi un fenomen cvasi-general. Cel mai adesea, secvenţele intron au dimensiuni cu mult mai mari decât cele exon (de peste 100 de ori), ceea ce ar constiui o explicaţie parţială a faptului că numai 5–10% din genomul eucariot reprezintă secvenţe codificatoare pentru proteine şi ARN.

Dacă secvenţele de nucleotide dintr-un ADN codificând o proteină nu sunt adiacente, ci secvenţele codificatoare sunt întrerupte de secvenţe necodificatoare, este evident că la eucariote nu se mai poate vorbi de colinearitatea genă-proteină, ci numai de o colinearitate exon-fragment din proteina specificată (corespunzând, probabil, unui domeniu funcţional al proteinei).

Excizia intronilor din transcriptele primare

Excizia intronilor din ARN precursor, biologic inactiv, se realizează pentru toate tipurile de ARN în nucleu, sub acţiunea unor enzime specializate, care trebuie să recunoască secvenţele de baze la joncţiunea intron-exon, să asigure juxtapunerea corectă a substratelor şi să efectueze actul catalitic.

În general, intronii au la capătul 5' secvenţa GU iar la cel 3' secvenţa AG încadrate adesea în secvente consens mai lungi. Există o categorie de introni în care, în amonte faţă de capătul 3' al intronului (50 nucleotide), este prezentă o secvenţă consens, parte a unui situs de ramificare, conţinând invariabil adenozina; în drojdii, secvenţa consens, diferită de cea a vertebratelor, este: 5'-TACTAAC-3'.

Mutaţii în vecinătatea unei joncţiuni intron-exon, cu precădere în dinucleotidul de la capetele intronului, interferă excizia intronilor putând genera un ARN inactiv, conţinând un intron rezidual. În unele β-thalasemii sinteza scăzută a lanţurilor β-globină s-ar datora unui defect de excludere a intronilor, având drept consecinţă incapacitatea ARN nuclear de a „ieşi" în citoplasmă pentru a fi citit.

Excizia intronilor din ARN_r

Cech şi Zaug au evidenţiat o modalitate cu totul surprinzătoare de excizie a intronilor dintr-un ARN ribozomal al unui protozoar ciliat — Tetrahymena termophila. Incubarea in vitro a ARN_r precursor (transcript primar) cu nucleozid trifosfaţi şi extract nuclear, ca sursă de enzimă catlizând procesul de excizie, a dus la concluzia că adaosul de extract nuclear era inutil. Se contura ideea intervenţiei autocatalitice a ARN_r în procesul de excizie-coasere, idee greu de acceptat, care extindea la acizii ribonucleici un atribut aparţinând exclusiv proteinelor.

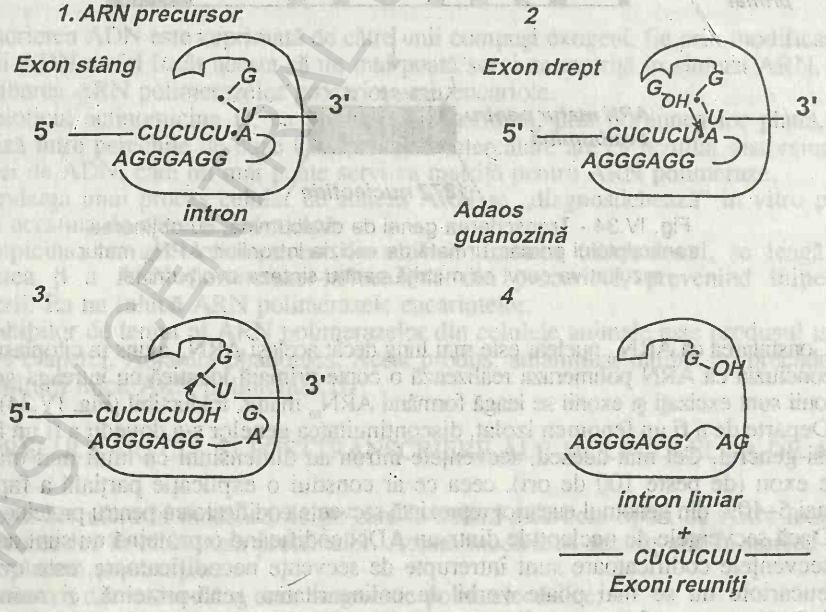


Fig. IV.35.a - Excizia autocatalitică a intronilor din ARN_r la Tetrahymena termophila

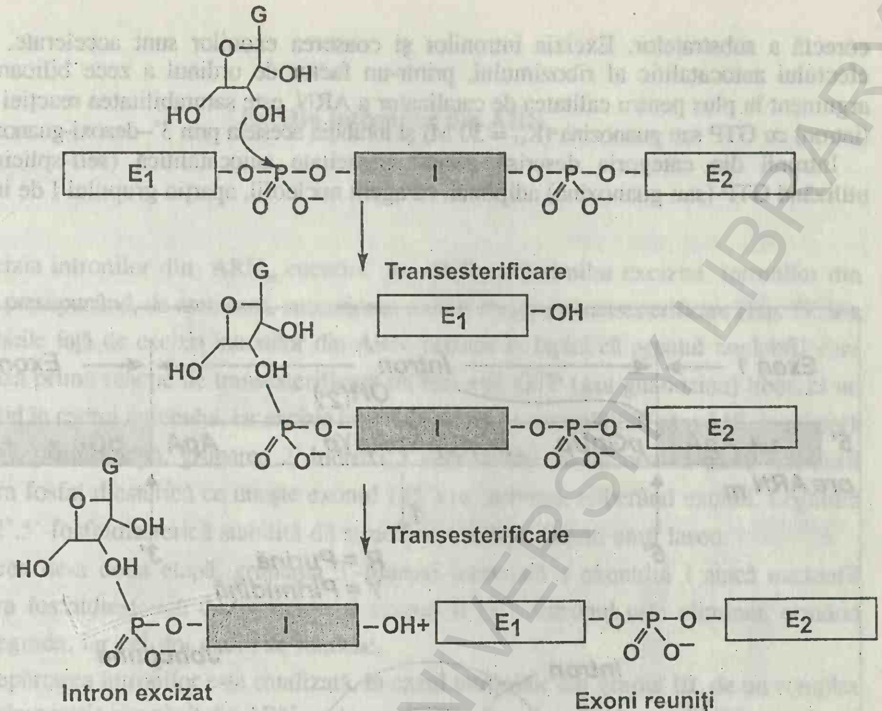


Fig. 35.b - Mecanismul transesterificării în reacţia de excizie

Lucrându-se în medii în care contaminarea cu proteină era exclusă (ARN_r obţinut prin tehnicile ingineriei genetice şi nu prin extracţie din nucleu), concluzia indubitabilă a fost aceea că ARN catalizează excizia intronilor şi coaserea propriilor exoni. (Fig. IV.35a şi b). Acestui tip de ARN_r, izolat din Tetrahymena termophila, i s-a dat numele de ribozim pentru a consfinţi activitatea sa catalitică. Spre deosebire de enzimele clasice, această enzimă având activitate autocatalitică nu se regăseşte neschimbată după actul catalitic.

În lămurirea mecanismului de acţiune a ribozimului decisivă a fost constatarea că la unul dintre capetele intronului excizat se găseşte un rest de guanozină care nu exista în ADN. GTP sau guanozina nu erau folosite în scopuri energetice, ci ca agent nucleofil apt să desfacă legătura fosfat diesterică de la unul dintre capetele intronului.

Legarea guanozinei la un loc specific din porţiunea intron o orientează astfel încât o grupare –OH a acesteia să poată ataca legătura fosfat diesterică de la joncţiunea exon-capătul 5' al intronului. La capătul 5' al exonului există o secvenţă de 6 nucleotide pirimidinice CUCUCU care se împerechează cu o porţiune din intron GGGAGG. Aşezată convenabil steric, guanozina atacă joncţiunea exon-intron la capătul 5'. Această reacţie de transesterificare are ca rezultat legarea guanozinei (G) la adenină (A) şi eliberarea capătului 3' al exonului I. Uracilul (U), devenit capătul 3'–OH liber al exonului I, efectuează o a doua transesterificare cu uracilul de la capătul 5' al exonului II, realizându-se, odată cu excluderea intronului, coaserea celor doi exoni (proces de „splicing") (Fig. IV.35).

De remarcat că activitatea catalitică a ARN_r este condiţionată de integritatea conformaţiei sale, întrucât, întocmai ca o enzimă, el trebuie să asigure juxtapunerea

corectă a substratelor. Excizia intronilor şi coaserea exonilor sunt accelerate, graţie efectului autocatalitic al ribozimului, printr-un factor de ordinul a zece bilioane. Un argument în plus pentru calitatea de catalizator a ARN_r este saturabilitatea reacţiei ARN_r (intron) cu GTP sau guanozina (K_M = 30 M) şi inhibiţia acesteia prin 3'–dezoxi-guanozină.

Intronii din categoria descrisă, având capacitate autocatalitică (self-splicing) şi utilizând GTP (sau guanozina) adiţional, ca agent nucleofil, aparţin grupului I de introni.

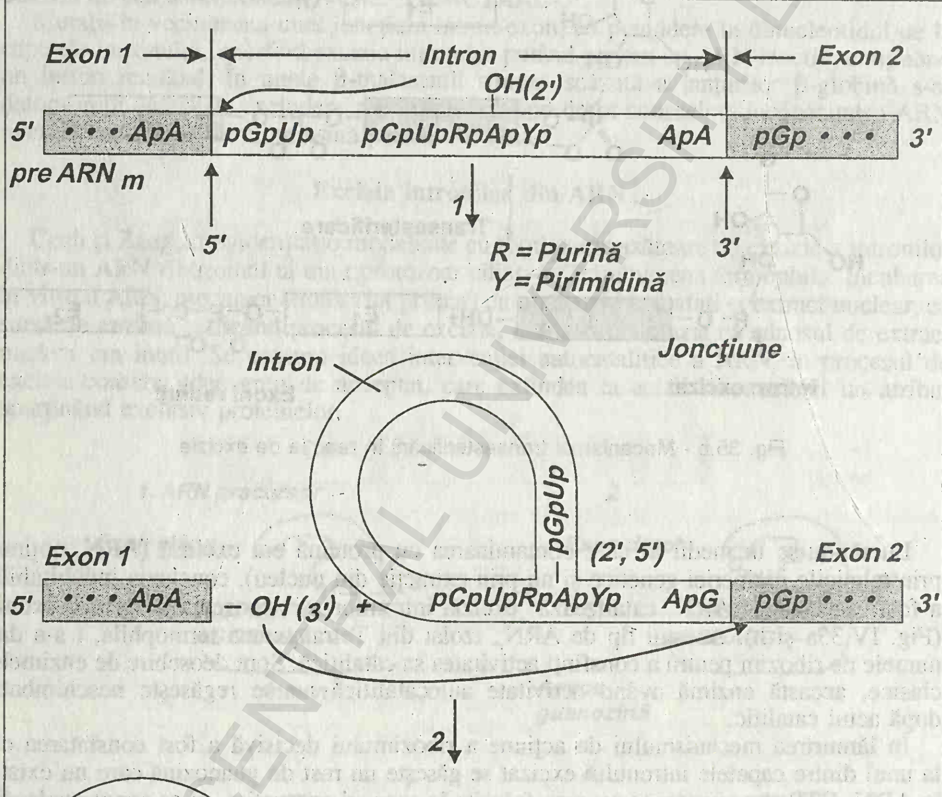


Fig. IV. 36 - Excizia intronilor din ARN_m

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Excizia intronilor din ARN_m

Excizia intronilor din ARN_m eucariot se desfăşoară similar exciziei intronilor din ARN_r, presupunând, de asemenea, succesiunea a două reacţii de transesterificare (Fig. IV.36). Deosebirile faţă de excizia intronilor din ARN_r constau în faptul că agentul nucleofil care operează prima reacţie de transesterificare nu mai este GTP (sau guanozina) liber, ci un nucleotid în cadrul intronului, iar excizia intronilor nu este autocatalitică (grupul III de introni).

Într-o primă etapă, gruparea 2'-hidroxi a unei unităţi de adenozină atacă nucleofil legătura fosfat diesterică ce uneşte exonul I (5') cu intronul, eliberând exonul. Legătura nouă 2',5'-fosfatdiesterică stabilită dă structurii rezultate forma unui lasou.

În cea de-a doua etapă, gruparea 3'-hidroxi terminală a exonului I atacă nucleofil legătura fosfatdiesterică dintre intron şi exonul II (3'). Intronul este eliminat, urmând a se degrada, iar cei doi exoni se reunesc.

Îndepărtarea intronilor este catalizată, în cazul intronilor din grupul III, de un complex ribonucleoproteic constituit din ARN nuclear scurt (small nuclear RNA = sn RNA), proteine şi ARN_m, subiect al prelucrării, care poartă numele de „splicozom" (spliceosome), prin analogie cu ribozomul. Se consideră că dimensiunea mare a splicozom-ului împiedică ARN_m precursor să părăsească nucleul înainte de prelucrarea sa completă la ARN_m matur.

ARN scurt, nuclear (60–300 nucleotide), bogat în uracil, participă sub forma a cinci specii diferite: U_1, U_2, U_4, U_5/U_6 desemnând şi tipul de ribonucleoproteine rezultate prin asociere cu proteine: $snRNPU_1$, $snRNPU_2$, ... (small nuclear ribonucleoprotein - colocvial citite snurp).

Recunoaşterea joncţiunii intron-exon ca şi a situsului de ramificare este asigurată de către snRNPU. Se admite că $snRNPU_1$ recunoaşte din ansamblul de transcripte ARN prezente în nucleu numai pe cele conţinând introni. $snRNPU_5$ se împerechează cu cei doi exoni ce flanchează intronul, ceea ce permite discriminarea între secvenţele GU şi AG la limita intron-exon şi alte secvenţe de acest fel. $RNPU_2$ se leagă la secvenţa consens din intron fiind implicată în selecţia punctelor de ramificare (Fig. IV.37). Interacţia între ARN_m precursor (premesager) şi celelalte tipuri de snRNPU nu este clarificată.

Asocierea ARN_m transcript primar cu snRNPU, presupunând o multitudine de interacţiuni (proteină-proteină, ARN-proteină, ARN-ARN) şi o riguroasă intrare în scenă a componenţilor, asigură înalta fidelitate a procesului de excizie-coasere a intronilor, realizat catalitic de componenta ARN a snRNPU.

Trecerea prin „furcile caudine" ale splicozomului face din ARN pre-mesager un ARN_m pe deplin matur, apt să ajungă în citosol pentru a fi citit şi tradus.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

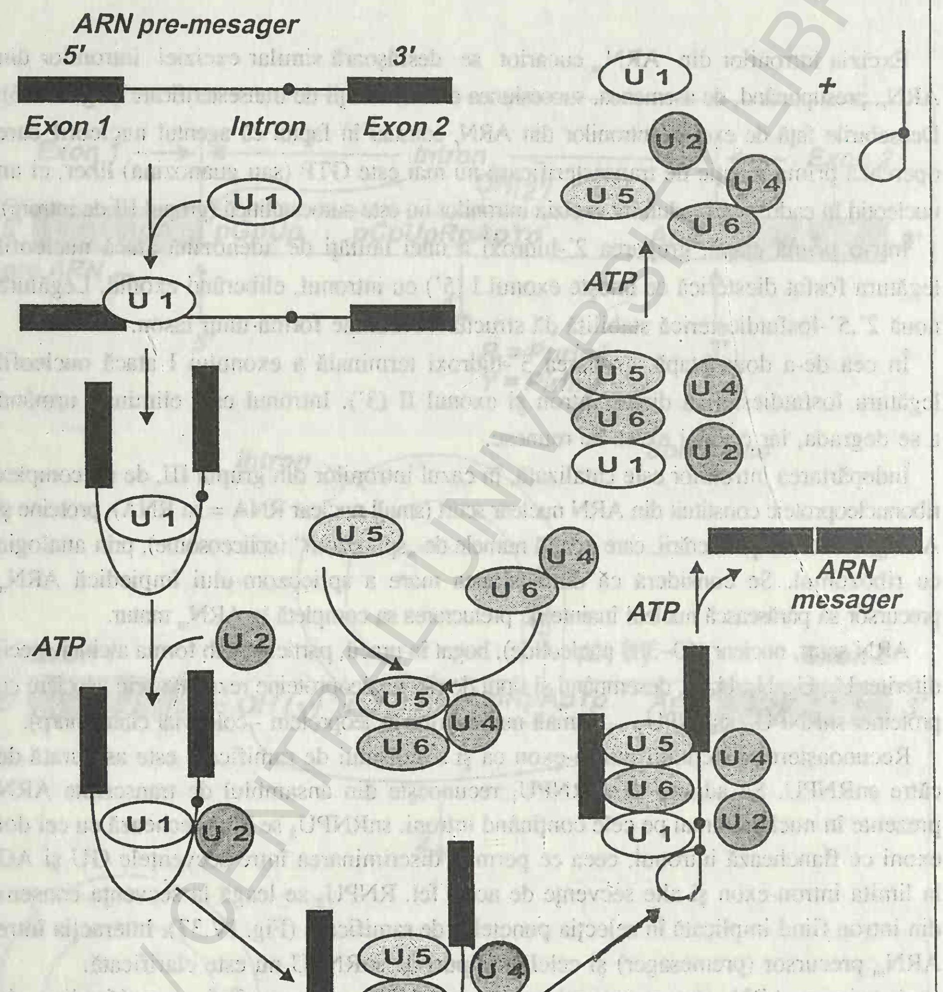


Fig. IV. 37 - Rolul SNURP în eliminarea intronilor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Excizia intronilor din ARN_t

Unele molecule de ARN_t eucariot conţin în vecinătatea regiunii anticodon succesiuni de nucleotide (20–40) ce corespund unor introni.

Spre deosebire de intronii din grupul I şi III, aceşti introni se exclud prin participarea unor protein-enzime organizate într-un sistem multienzimatic având printre multiplele sale activităţi şi pe cele de endonuclează şi ligază (Fig. IV.38).

Din demonstrarea capacităţii catalitice a ARN rezultă o idee fundamentală din punct de vedere teoretic: dualitatea funcţională a moleculei de ARN care, pe lângă calitatea de a fi o moleculă informaţională, o are şi pe aceea de a funcţiona drept catalizator. După aprecierea lui Cech, diviziunea muncii în celulă nu pare să fie chiar atât de strictă.

Problema discontinuităţii genelor la eucariote este o temă fascinantă de biologie, care pune o serie de întrebări al căror răspuns, cel puţin deocamdată, este departe de a fi satisfăcător. În ce moment al evoluţiei, cum şi în ce scop au apărut intronii? Procariotele actuale sunt identice ca genom cu cele din care au provenit eucariotele? Dacă nu, este posibil ca şi procariotele să fi dispus de gene discontinue şi ca variaţia posibilităţilor de excizie a intronilor să fi servit evoluţiei, îmbogăţind „repertoriul“ de proteine al acestora. Cu timpul, este probabil ca procariotele să fi „renunţat“ la ADN necodificator, astfel încât să-şi mărească viteza de creştere prin scăderea cantităţii de ADN ce trebuia replicată în fiecare generaţie.

Este prezenţa intronilor avantajoasă eucariotelor sau pur şi simplu s-au păstrat prin lipsa unui aparat de excludere a intronilor? S-ar părea că prezenţa lor este avantajoasă.

Se conturează ipoteza intervenţiei intronilor în procesul de diferenţiere celulară. Mai mult, transportul ARN din nucleu în citoplasmă pare să depindă de prezenţa intronilor. Într-adevăr, unii ARN obţinuţi prin transcrierea ADN complementari unor ARN maturi (sub acţiunea revers transcriptazei) nu părăsesc nucleul; probabil, unii introni codifică porţiuni dintr-o enzimă, maturaza, implicată în însuşi transportul ARN.

Cercetări recente au demonstrat o mare flexibilitate a „aparatului de excizie-sudură“ a diverselor regiuni din ARN_m la eucariote întrucât, dintr-un singur transcript primar pot rezulta numeroşi ARN_m maturi şi deci proteine diferite (splicing alternativ). Chiar dacă dintr-un singur transcript primar se obţin proteine diferite, caracterul monocistronic al ARN_m eucariot se păstrează, întrucât un singur tip de ARN_m matur şi un singur polipeptid rezultă într-un anumit tip de celulă, la un moment dat, prin procesări diferite.

Un exemplu de splicing alternativ îl oferă transcriptul primar pentru tropomiozină — proteină a aparatului contractil ce prezintă diferenţe structurale în diverse ţesuturi. O genă unică generează un transcript primar unic în toate ţesuturile care conţin tropomiozină. Prin tratarea diferenţiată a exonilor — în unele ţesuturi aceştia sunt trataţi ca introni — se obţin tipuri diferite de ARN_m matur şi deci tropomiozine diferite funcţie de ţesut (Fig. IV.39).

Exonii exprimaţi în toate ţesuturile sunt desemnaţi ca fiind constitutivi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

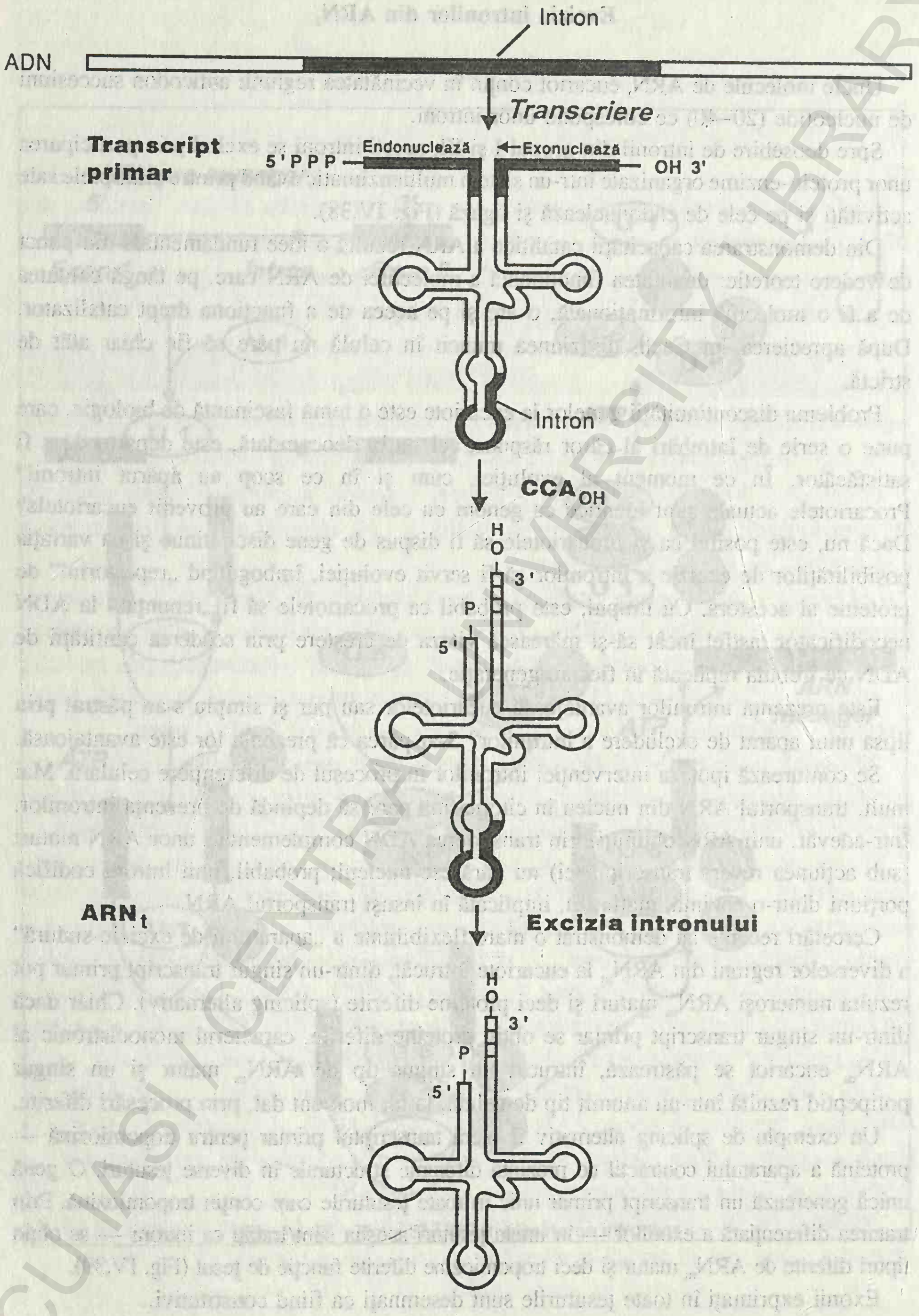


Fig. IV.38 - Prelucrări posttranscriere ale ARN_t

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

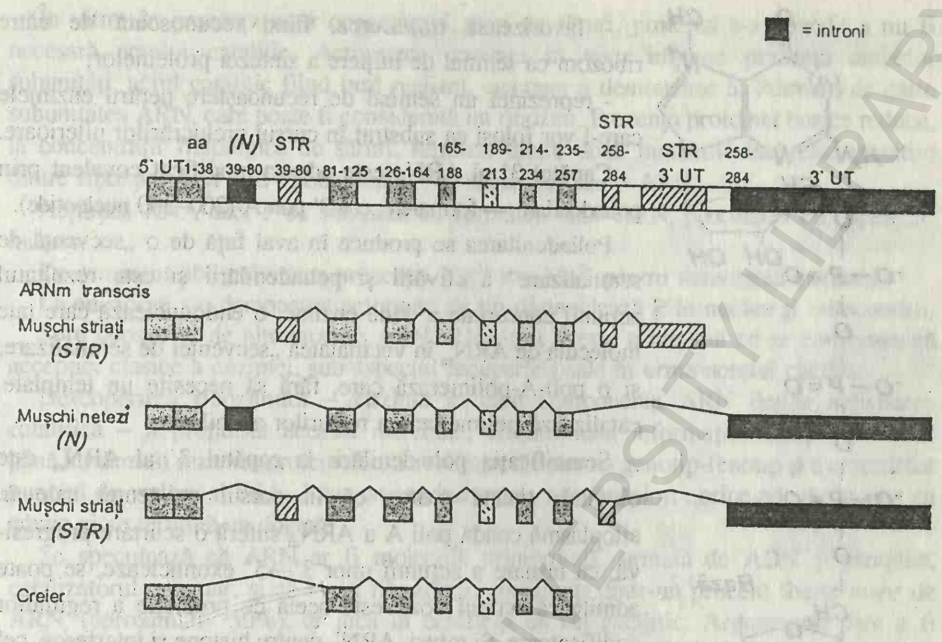


Fig. IV.39 - Organizarea genei α-tropomiozinei la şobolan; alternativele de transcriere determină specificitatea celulară

Modificări posttranscriere adiţionale

Pe lângă excluderea intronilor prezenţi în ARN eucariot (şi în foarte puţine procariote — mai ales din clasa bacteriilor arhaice), numeroase prelucrări adiţionale, diferind cu tipul de ARN, desăvârşesc trecerea de la ARN transcript primar la ARN matur, funcţional, succesiunea lor temporală fiind stabilită cu aproximaţie.

Modificări adiţionale ale ARN mesager eucariot

Spre deosebire de ARN_m procariot care este tradus în timp ce este sintetizat, deci se naşte matur, la eucariote ARN_m devine funcţional numai după modificarea capetelor 5' şi 3'.

Capătul 5' al ARN_m este modificat covalent într-un proces considerat a fi cotranscripţional, întrucât se realizează chiar înainte ca deplasarea ARN polimerazei II din situsul de iniţiere a transcrierii să fi avut loc. Modificarea constă în adăugarea unui rest de 7-metil guanozină legat prin legătură 5'–5' trifosfat de transcriptul primar (Fig. IV.40).

La unele specii modificarea la capătul 5' include şi metilarea grupării 2' hidroxi din nucleotidul ultim, uneori şi penultim, din fostul transcript primar.

„Marcarea" capătului 5' al ARN_m este necesară întrucât:

- protejează molecula de acţiunea 5'–3' exonucleazelor;

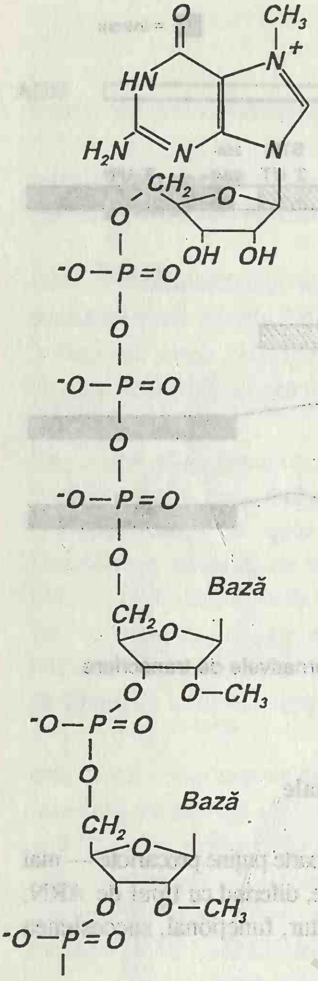


Fig. IV.40 - Marcarea capătului 5' al ARN_m

- favorizează tra...cerea, fiind recunoscută de către ribozom ca semnal de iniţiere a sintezei proteinelor;
- reprezintă un semnal de recunoaştere pentru enzimele care-l vor folosi ca substrat în cursul prelucrărilor ulterioare.

Capătul 3' al ARN_m este adesea modificat covalent prin poliadenilare — formarea „cozii" poli A (200–300 nucleotide).

Poliadenilarea se produce în aval faţă de o „secvenţă de semnalizare" a clivării şi poliadenilării şi este rezultatul acţiunii concertate a două enzime: o endonuclează care taie molecula de ARN_m în vecinătatea „secvenţei de semnalizare: şi o poli-A-polimerază care, fără să necesite un template, catalizează polimerizarea resturilor adenilat.

Semnificaţia poliadenilării la capătul 3' al ARN_m este obscură; ţinând seama că în cursul existenţei sale în citoplasmă coada poli A a ARN_m suferă o scurtare progresivă, ca urmare a acţiunii unor 3'→5' exonucleaze, se poate admite că scopul cozii este acela de protecţie a regiunilor codificatoare. Şi totuşi, ARN_m pentru histone şi interferon, cel puţin, nu sunt poliadenilaţi.

In vitro, prezenţa cozii poli A s-a dovedit extrem de utilă. Ea serveşte ca iniţiator în sinteza ADN pe matriţă de ARN, deci la obţinerea ADN_c ("C" pentru complementar), utilizat în tehnicile de clonare ca şi la izolarea şi purificarea ARN_m din totalul de ARN celular din care el reprezintă o mică parte.

Prelucrarea ARN_m eucariot se încheie cu excizia intronilor (vezi anterior).

Modificări adiţionale ale ARN de transfer

La procariote, ca şi la eucariote, transcriptul primar conţine mai mulţi ARN_t precursori (multimeric). ARN_t precursori monomerici, având extensii 5' şi 3' relativ scurte, se obţin prin acţiunea unui mare număr de ribonucleaze (Fig. IV.38)

În obţinerea capătului 5' al ARN_t matur este implicată o ribonuclează cu activitate endonucleazică şi anume Ribonucleaza P (RNA-aza P), constituită dintr-o subunitate ARN de câteva sute de nucleotide şi o proteină cu caracter bazic, cu masă moleculară de aproximativ 14 kD.

În vitro, în prezența unor concentrații mari de săruri, proteina s-a dovedit a nu fi necesară actului catalitic. Activitatea enzimei in vivo impune prezența ambelor subunități, actul catalitic fiind însă realizat, aşa cum a demonstrat S. Altman, de către subunitatea ARN, care poate fi considerată un ribozim. Prezența proteinei bazice reduce, la concentrații fiziologice de săruri, repulsia dintre două molecule încărcate negativ: dintre ribozim – un ARN polianionic – şi substratul său – ARN_t.

Acțiunea RNA-azei P se soldează cu formarea unor ARN_t precursori cu capete 5' mature.

De remarcat obligativitatea prezenței Mg^{2+} sau Mn^{2+} pentru activitatea enzimei.

La eucariote s-a demonstrat activitate de tip ribonuclează P în nucleu şi mitocondrii.

Spre deosebire de alte enzime ARN, RNA-aza P este o enzimă ce se conformează accepției clasice a enzimei, sub aspectul recuperării sale în urma actului catalitic.

Descoperirea ribozimilor – enzime în care componenta ARN deține activitatea catalitică – a propulsat această moleculă, dintotdeauna informațională, pe un teren până nu demult rezervat proteinelor, a desființat dihotomia genotip-fenotip şi a consolidat punctul de vedere al lui L. Johnson privind soarta adevărurilor: „orice adevăr începe ca erezie şi se termină ca dogmă".

Se speculează că ARN ar fi molecula primordială, urmată de ADN şi proteine, catalizatorul originar, şi că înşişi ribozomii, constituiți dintr-un procent foarte mare de ARN_r (aproximativ 50%), ar juca în celulă şi un rol catalitic. Argumentul pare a fi „servit" de către Noller şi colaboratorii care au demonstrat că ARN_r necontaminat de proteine, este apt să catalizeze sinteza legăturii peptidice.

Obținerea capătului 3' matur al ARN_t, din transcriptele primare multimerice, presupune o activitate exonucleazică soldată, în cazul procariotelor, cu revelarea capătului CCA (toate genele pentru ARN_t codifică secvența CCA terminus). În cazul eucariotelor, secvența CCA este adăugată ulterior de către o nucleotidil-transferază având ca substrate ATP şi CTP.

O modificare covalentă pe care o suferă atât ARN_t procariot cât şi cel eucariot constă în modificarea unor baze sau a ozei. Aceste modificări enzimatic-catalizate constau în alchilări, tiolări, hidrogenări, şi decurg, în speță, în regiuni de ARN_t în care nu există baze complementare (vezi IV 4.1.).

Modificări adiționale ale ARN ribozomal

Prelucrarea ARN_r decurge similar la procariote şi eucariote şi presupune clivarea unor transcripte primare de mari dimensiuni la transcripte de dimensiuni mai mici: 30S pentru eucariote şi 45S pentru procariote. Acestea vor genera molecule de ARN_r, matur: 23S, 16S, 5S ARN_r pentru procariote şi 28S, 18S şi 5,8S ARN_r pentru eucariote, după îndepărtarea fragmentelor spațiatoare şi, în cazul procariotelor, a ARN_t obținut prin transcrierea unor gene ARN_t intruse (Fig. IV.41).

De menționat că ARN_r 45S rezultă prin transcrierea, operată în nucleol, de către ARN polimeraza I, a sute de gene ARN_r separate. ARN_r 5S rezultă dintr-o moleculă precursoare diferită, obținută prin transcrierea unei gene, 5S, de către ARN polimeraza III.

Obținerea ARN_r matur implică, atât la procariote cât şi la eucariote, modificarea prin metilare a unor baze.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

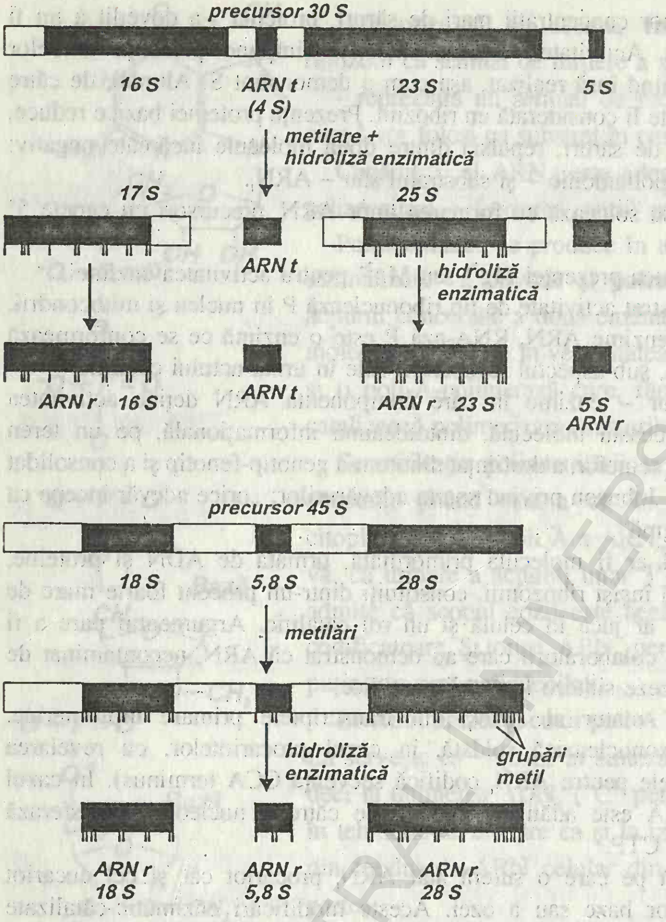


Fig. IV.41 - Modificări post transcriere ale moleculelor de ARN

Modificări adiţionale ale ARN nuclear de mici dimensiuni

Sintetizat de către ARN polimeraza II, acest tip de ARN transcript primar va primi la capătul său 5' un rest de 7-metil-guanozină (ca şi ARN_m) în cursul unui proces contranscripţional.

După ce ARN „scurt" ajunge în citosol, o metilază locală îl hipermetilează dând un capăt 5' ce conţine 2,2,7 trimetil guanozină (m3G); metilarea se realizează numai după asocierea ARN nuclear „scurt" cu proteine specifice sintetizate în citosol.

Ribonucleoproteinele rezultate sunt importate de nucleu, deşi proteina nu are semnalele caracteristice proteinelor de import.

S-a demonstrat că introducerea m3G este necesară transportului în nucleu, mediat receptorial, ca şi legarea prealabilă la proteine.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din necesitatea ca particula să aibă ambele semnale pentru a fi importată s-ar putea deduce că numai particulele corect asamblate au acces în nucleu, unde au de îndeplinit funcţii specifice.

IV.4.4. BIOSINTEZA ARN PE MATRIŢĂ DE ARN

Unele virusuri conţin ca material cromozomial ARN. Replicarea acestui ARN în celula gazdă are loc sub acţiunea unei replicaze, o ARN polimerază ARN-dependentă, analoagă, ca mecanism de acţiune, ARN polimerazei ADN-dependentă.

Replicazele se sintetizează în organismul gazdă ca răspuns la infecţia virală. Ele manifestă o specificitate surprinzătoare, folosind ca matriţă exclusiv ARN omolog (al virusului cu care a fost infectată celula). În felul acesta, în celula gazdă are loc replicarea ARN viral, nu şi a ARN al celulei gazdă. ARN sintetizat pe matriţă de ARN omolog nu este complementar, ci identic cu acesta. După infecţie se sintetizează pe matriţa ARN (+) o replică complementară (–), luând naştere o dublă elice constituită dintr-o catenă ARN (+) şi una ARN (–). Catena ARN (–) va servi apoi ca matriţa pentru sinteza a numeroase catene complementare (+) (Fig. IV.42).

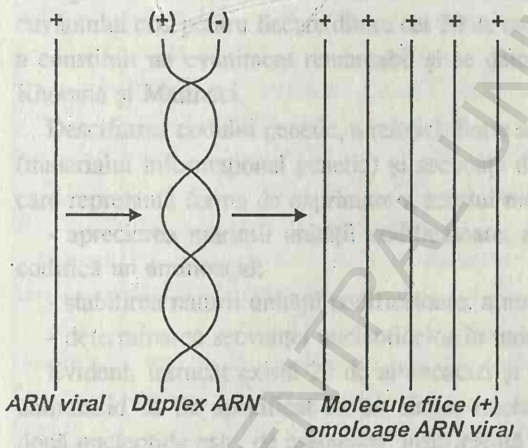


Fig. IV.42 - Sinteză de ARN pe matriţă de ARN

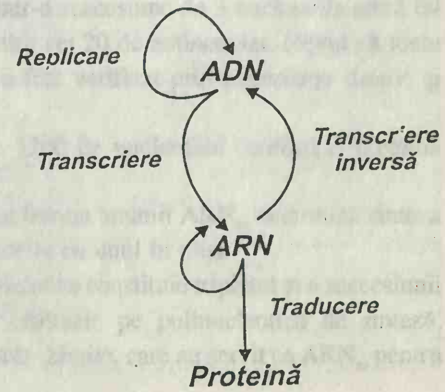


Fig. IV.43 - Completarea dogmei centrale a geneticii moleculare prin prisma descoperirii ADN polimerazei ARN-dependentă şi ARN polimerazei ARN-dependentă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ARN viral va funcţiona ca ARN_m pentru sinteza proteinelor virale (spre deosebire de ARN al retrovirusurilor).

Ţinând seama atât de existenţa ADN polimerazei – ARN-dependentă (revers transcriptaza), cât şi de a ARN replicazelor, dogma centrală a geneticii moleculare trebuie reconsiderată în sensul indicat în Fig. IV.43.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. V. BIOSINTEZA PROTEINELOR
(Traducerea mesajului genetic)

V.1. CODUL GENETIC

Aşa cum s-a arătat anterior, informaţia genetică - mesajul genetic - cu privire la biosinteza proteinelor este conţinut în secvenţa de nucleotide din ADN. Acest mesaj este transmis codificat în citoplasmă, locul de biosinteză a proteinelor, prin sinteză de ARN_m.

Secvenţa de nucleotide dintr-un anumit ARN_m trebuie tradusă într-o succesiune specifică de aminoacizi, corespunzând unui lanţ polipeptidic. În citoplasmă trebuie să aibă loc decodificarea ARN_m, respectiv traducerea limbajului nucleotidic în care este scris acesta, în limbaj aminoacidic. Este de presupus că unui anumit aminoacid îi corespunde un cuvânt cod format dintr-o anumită succesiune de nucleotide. Identificarea cuvântului cod pentru fiecare dintre cei 20 de aminoacizi ce intră în structura proteinelor a constituit un eveniment remarcabil şi se datorează lucrărilor lui Nierenberg, Ochoa, Khorana şi Matthaei.

Descifrarea codului genetic, a relaţiei dintre secvenţa de nucleotide din acizii nucleici (materialul informaţional genetic) şi secvenţa de aminoacizi dintr-un lanţ polipeptidic, care reprezintă forma de exprimare a acestui mesaj, a ridicat numeroase probleme:

- aprecierea mărimii unităţii codificatoare, respectiv a numărului de nucleotide ce codifică un aminoacid;
- stabilirea naturii unităţii codificatoare, a nucleotidelor ce formează unitatea;
- determinarea secvenţei nucleotidelor în unitatea codificatoare.

Evident, întrucât există 20 de aminoacizi şi numai 4 nucleotide, este exclus ca un aminoacid să fie specificat de un singur nucleotid. Specificarea unui aminoacid prin două nucleotide este, de asemenea, insuficientă întrucât se pot obţine numai 16 cuvinte cod. În schimb, construirea unui cuvânt cod dintr-o succesiune de 3 nucleotide oferă 64 de posibilităţi, respectiv 64 de cuvinte cod pentru cei 20 de aminoacizi. Faptul că toate cuvintele cod sunt triplete, denumite codoni, a fost verificat prin experienţe simple şi expresive cum ar fi:

- un ARN_m viral monogenic constituit din 1200 de nucleotide codifică o proteină conţinând 400 de aminoacizi;
- deleţia (excluderea) sau inserţia unui triplet într-un anumit ARN_m determină sinteza unei proteine cu un aminoacid mai puţin, respectiv cu unul în plus.

În ceea ce priveşte stabilirea naturii nucleotidelor ce constituie tripletul şi a succesiunii lor în acesta, decisive au fost experienţele efectuate pe polinucleotide de sinteză, constituite din acelaşi nucleotid sau din nucleotide diferite, care au servit ca ARN_m pentru

sinteza unor proteine în sisteme acelulare. De pildă, dacă se utilizează ca ARN_m un polinucleotid adenilic se obţine o proteină constituită exclusiv din lizină. Rezultă că lizinei îi corespunde tripletul AAA. Analog, un polinucleotid uridilic dă naştere unui lanţ polifenilalaninic, unul policitidilic edifică o poliprolină; rezultă cuvintele cod pentru fenilalanină (UUU) şi pentru prolină (CCC). „Sensul" celorlalţi codoni s-a stabilit prin utilizarea unor heteropolinucleotide cu secvenţă cunoscută, ţinându-se seama de faptul că direcţia de traducere a moleculei de ARN_m este 5'-3'.

Secvenţa bazelor într-un codon s-a precizat ca urmare a unei experienţe ingenioase imaginate de Nirenberg care a pus în contact un triplet nucleotidic sintetizat în laborator (având o succesiune de baze cunoscută) cu ribozomi şi 20 de complexe aminoacil~ARN_t, dintre care unul singur era marcat ^{14}C aminoacil~ARN_t) şi apoi a filtrat amestecul pe nitroceluloză. Pe filtrul de celuloză este reţinut numai acel ^{14}C aminoacil~ARN_t care s-a împerecheat prin porţiunea anticodon cu tripletul utilizat, legat specific la ribozomi. S-a demonstrat astfel, de exemplu, că tripletul UGU codifică cisteina, UUG, leucina, iar GUU, valina.

În tabelul V.1. este redat codul genetic.

Tabelul V.1.

Codul genetic

I	*II*				*III*
	U	*C*	*A*	*G*	
U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC	UCC Ser	UAC	UGC	C
	UUA Leu	UCA	UAA Codon terminator	UGA Codon terminator	A
	UUG	UCG	UAG	UGG Trp	G
C	CUU	CCU	CAU His	CGU	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC	CGC Arg	C
	CUA	CCA	CAA Gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC	GGC Gly	C
	GUA	GCA	GAA Glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Întrucât nu există semnale care să indice începutul şi sfârşitul fiecărui codon, citirea mesajului genetic se face neîntrerupt, de la un codon start până la un codon terminator. Punctul de start în citire este reprezentat de un semnal de iniţiere incluzând, invariabil, codonul de iniţiere AUG. Codul genetic nu are deci, virgule, semne de punctuaţie.
- Codul genetic este degenerat, mai exact, redundant.

Dintre cele 64 de triplete 61 codifică aminoacizi particulari. Cum nu există decât 20 de aminoacizi ce trebuie specificaţi, rezultă că unui singur aminoacid îi pot corespunde mai multe cuvinte cod. Într-adevăr, aşa cum se vede din tabelul V.1, numai triptofanul şi metionina sunt specificaţi de către un singur codon, în timp ce alţi aminoacizi, cum ar fi de exemplu serina şi leucina, sunt codificaţi de către 6 codoni fiecare (codoni sinonimi). Degenerarea codului, respectiv existenţa mai multor cuvinte cod pentru acelaşi aminoacid, se manifestă în special la nivelul nucleotidului 3 din codon. Într-adevăr, este uşor de observat că, în general, primele două baze ale codonilor sinonimi sunt constante. Crick a conchis că asocierea nucleotidelor 1 şi 2 din codon cu nucleotidele 3 şi 2 din anticodon este fermă, respectând principiul complementarităţii A, U şi C, G, în timp ce împerecherea nucleotidului 3 din codon cu 1 din anticodon este, în general, laxă. Aceasta s-ar datora particularităţii nucleotidului 1 (capătul 5') din anticodon de a se împerechea şi cu alte nucleotide, încălcând regulile Watson-Crick (A, U; C, G). De exemplu, în poziţia 1 a anticodonului, uracilul se poate lega cu A dar şi cu G (slab), iar guanina se poate lega cu C, dar şi cu U (slab), din poziţia 3 a codonului. Frecvent prezentă ca nucleotidul 1 în anticodon, inozina se poate lega de citozină, ca şi de uracil sau adenină, dar legăturile sunt slabe. Când însă în poziţia 1 a anticodonului se găseşte C sau A, acestea se pot lega numai după regula Watson-Crick cu G, respectiv U din poziţia 3 a codonului, stabilind legături ferme.

În poziţia 1 a anticodonului există deci, în mulţi ARNt, o bază „şovăielnică", „nedecisă", „oscilantă", dispusă să încalce regulile de complementaritate Watson-Crick (efectul wobble). Un ARN_t conţinând un astfel de anticodon poate recunoaşte şi se poate lega la mai mulţi codoni care specifică acelaşi aminoacid (s-au identificat 51 de tipuri de ARN_t); cel mai adesea legăturile sunt slabe.

Raţiunea biologică a complexităţii interacţiunilor codon-anticodon ar decurge din necesitatea de a asigura atât acurateţea împerecherii cât şi promptitudinea disocierii complexului ARN_t-ARN_m, care nu trebuie să devină un factor limitant al vitezei procesului de biosinteză a proteinelor. Departe de a fi un semn de imperfecţiune, degenerarea codului minimalizează efectele mutaţiilor, prin redundanţa informaţiei.

De remarcat că trei codoni din cei 64 (UAA, UGA, UAG) nu specifică nici un aminoacid. Aceşti codoni, denumiţi „non sens", reprezintă de fapt semnale de întrerupere a traducerii ARN_m. Un lanţ polipeptidic, sintetizat pe un anumit ARN_m, îşi încetează creşterea atunci când citirea ARN_m a ajuns la un codon non sens.

- Codul genetic nu este ambiguu, niciodată acelaşi triplet nu semnifică doi aminoacizi diferiţi.

- Codul genetic este universal-toate vieţuitoarele utilizează acelaşi cod genetic pentru a traduce genele lor specifice în proteine specifice. O abatere surprinzătoare de la universalitate ne relevă codul genetic al mitocondriei. Astfel, codonul AUA corespunde metioninei, şi nu izoleucinei, codonul UGA corespunde triptofanului, nefiind un codon non sens, codonii AUA şi AUU sunt codoni de iniţiere şi nu codonii ce specifică izoleucina ş.a.m.d..

V.2. BIOSINTEZA PROTEINELOR

Edificarea unei macromolecule proteice este, probabil, cel mai complex proces biosintetic ce decurge în lumea vie, implicând conlucrarea a peste 300 de macromolecule reprezentate de protein - enzime, cu funcţii distincte în acest proces, şi de diverse tipuri de acizi ribonucleici.

Procesul de biosinteză a proteinelor presupune traducerea limbajului de patru litere al acizilor nucleici (4 nucleotide) în limbajul de 20 de litere (20 de aminoacizi) al proteinelor.

În cadrul transferului de informaţie, în organismele pro- şi eucariote, etapa de biosinteză a proteinelor este desemnată drept etapa de traducere a mesajului genetic înscris în ADN şi transcris în ARN_m. Această etapă decurge la nivelul ribozomilor şi se derulează, în principiu, prin adăugarea succesivă a câte unui rezidu aminoacidic la capătul carboxi terminal în creştere. Atât în cazul procariotelor cât şi în cel al eucariotelor, biosinteza proteinelor implică 5 etape:

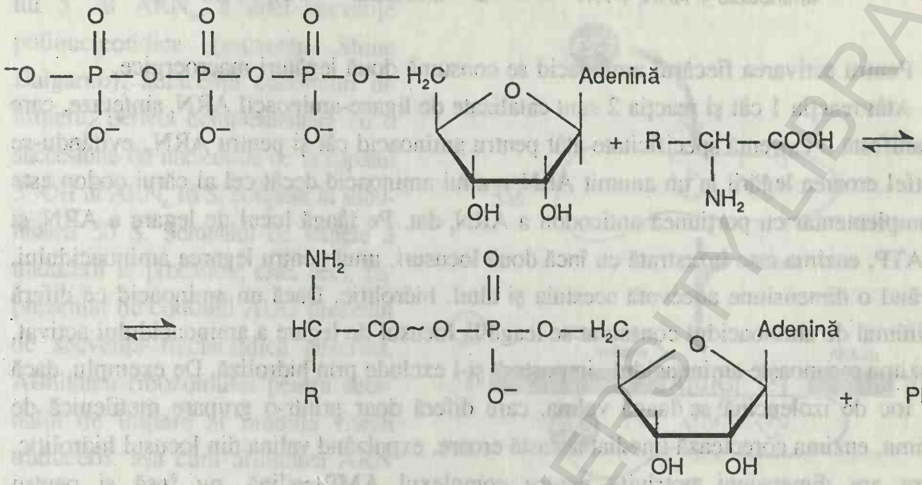
- activarea aminoacizilor
- iniţierea lanţului polipeptidic
- elongarea lanţului polipeptidic
- terminarea edificării proteinei şi eliberarea sa
- prelucrări posttraducere ale proteinei sintetizate.

I. Activarea aminoacizilor

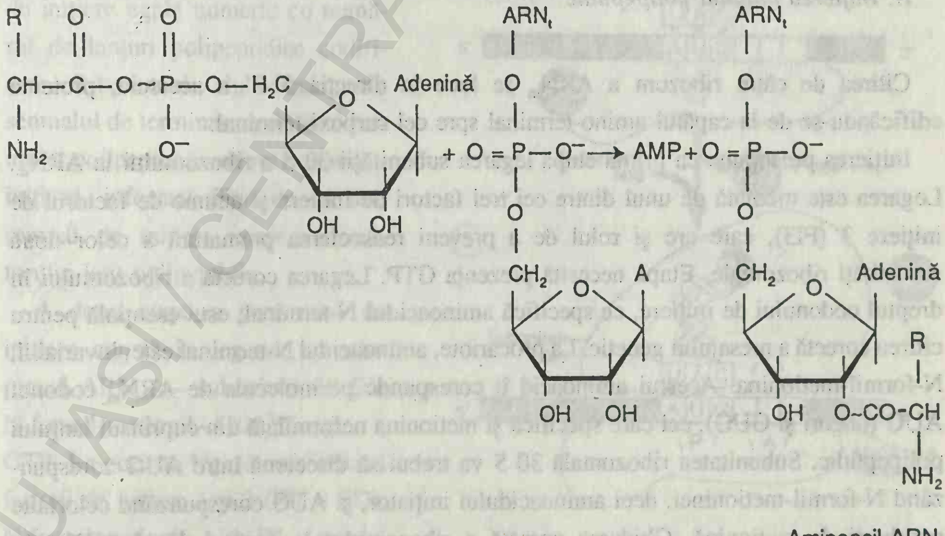
Participarea aminoacizilor la biosinteza legăturii peptidice, care este un proces endergonic, impune activarea prealabilă a acestora. Activarea are loc în urma reacţiei aminoacidului cu ATP. Se formează complexul aminoacil~AMP, care conţine o legătură macroergică de tip anhidridă mixtă şi pirofosfat. Hidroliza ulterioară a

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pirofosfatului, sub acţiunea pirofosfatazei, deplasează echilibrul spre dreapta, făcând reacţia ireversibilă.



Complexul aminoacil~adenilat cedează restul aminoacid activat unei molecule de ARN_t specifică aminoacidului dat (al cărui anticodon corespunde codonului ce specifică aminoacidul respectiv), permiţându-i ARN_t să-şi exercite funcţia de transport şi adaptare a aminoacizilor. ARN_t leagă aminoacidul la capătul CCA şi anume la gruparea –OH din poziţia 2' sau 3' a nucleotidului adenilic, cu formarea unei legături esterice, în mod excepţional, macroergică.



Aminoacil-ARN_t

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacţia globală de activare a aminoacidului poate fi scrisă:

$$\text{aminoacid} + ARN_t + ATP \longrightarrow \text{aminoacil} \sim ARN_t + AMP + 2P$$

Pentru activarea fiecărui aminoacid se consumă două legături macroergice.

Atât reacţia 1 cât şi reacţia 2 sunt catalizate de ligaze-aminoacil ARN_t sintetaze, care manifestă o extremă specificitate atât pentru aminoacid cât şi pentru ARN_t, evitându-se astfel eroarea legării la un anumit ARN_t a altui aminoacid decât cel al cărui codon este complementar cu porţiunea anticodon a ARN_t dat. Pe lângă locul de legare a ARN_t şi a ATP, enzima este înzestrată cu încă două locusuri, unul pentru legarea aminoacidului, având o dimensiune adecvată acestuia şi altul, hidrolitic. Dacă un aminoacid ce diferă minimal de aminoacidul consacrat se leagă la locusul de legare a aminoacidului activat, enzima recunoaşte aminoacidul „impostor" şi-l exclude prin hidroliză. De exemplu, dacă în loc de izoleucină se leagă valina, care diferă doar printr-o grupare metilenică de prima, enzima corectează imediat această eroare, expulzând valina din locusul hidrolitic, care are dimensiuni potrivite pentru complexul AMP~valină, nu însă şi pentru AMP~izoleucină. Prin hidroliza complexului valil~AMP, valina este eliminată şi enzima leagă corect izoleucina.

Fidelitatea procesului de traducere-respectiv adaptarea corectă a aminoacidului pe matricea de ARN_m şi stabilirea secvenţei de aminoacizi caracteristică proteinei de sintetizat este, în mare măsură, asigurată de capacitatea de autocontrol a ARN_t sintetazelor.

II. Iniţierea lanţului polipeptidic

Citirea de către ribozom a ARN_m se face în direcţia 5'-3' a acestuia, proteina edificându-se de la capătul amino-terminal spre cel carboxi-terminal.

Iniţierea presupune ca primă etapă legarea subunităţii 30 S a ribozomului la ARN_m. Legarea este mediată de unul dintre cei trei factori de iniţiere şi anume de factorul de iniţiere 3 (FI3), care are şi rolul de a preveni reasocierea prematură a celor două subunităţi ribozomale. Etapa necesită prezenţa GTP. Legarea corectă a ribozomului în dreptul codonului de iniţiere, ce specifică aminoacidul N-terminal, este esenţială pentru citirea corectă a mesajului genetic. La procariote, aminoacidul N-terminal este, invariabil, N-formil-metionina. Acestui aminoacid îi corespunde pe molecula de ARN_m codonul AUG (uneori şi GUG), cel care specifică şi metionina neformilată din cuprinsul lanţului polipeptidic. Subunitatea ribozomală 30 S va trebui să discearnă între AUG corespunzând N-formil-metioninei, deci aminoacidului iniţiator, şi AUG corespunzând celorlalte reziduuri de metionină. Ghidarea corectă a ribozomului la capătul 5' al ARN_m, în

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dreptul codonului de iniţiere, este posibilă datorită prezenţei la capătul 5' al ARN_m a unei secvenţe polinucleotidice (secvenţa Shine Dalgarno), adiacentă codonului de iniţiere, perfect complementară cu o succesiune de nucleotide de la capătul 3'-OH al ARN_r 16 S, conţinut în subunitatea 30 S. Semnalul de iniţiere a traducerii la procariote este, deci, reprezentat de codonul AUG precedat de secvenţa nucleotidică descrisă. Afinitatea ribozomului pentru semnalul de iniţiere ar modula viteza traducerii, aşa cum afinitatea ARN polimerazei pentru promotor modulează viteza transcrierii.

Aşa cum s-a menţionat anterior, la procariote, mulţi ARN_m sunt policistronici, codificând două sau mai multe polipeptide. Pe un astfel de ARN_m există multiple semnale de iniţiere egale numeric cu numărul de lanţuri polipeptidice codificate. Ribozomul, alunecând peste semnalul de terminare a sintezei primului polipeptid (codonul non sens), iniţiază, informat fiind de un nou semnal de iniţiere, sinteza următorului lanţ polipeptidic.

A doua etapă a procesului de iniţiere constă în legarea la complexul ARN_m — subunitate 30 S a N-formil-metionil~ARN_t^{fmet} şi a GTP. La această legare colaborează factorii de iniţiere 1 şi 2 (FI1 + FI2). N-formil-metionil~ARN_t^{fmet} rezultă prin formilarea metionil~ARN_t^{fmet},

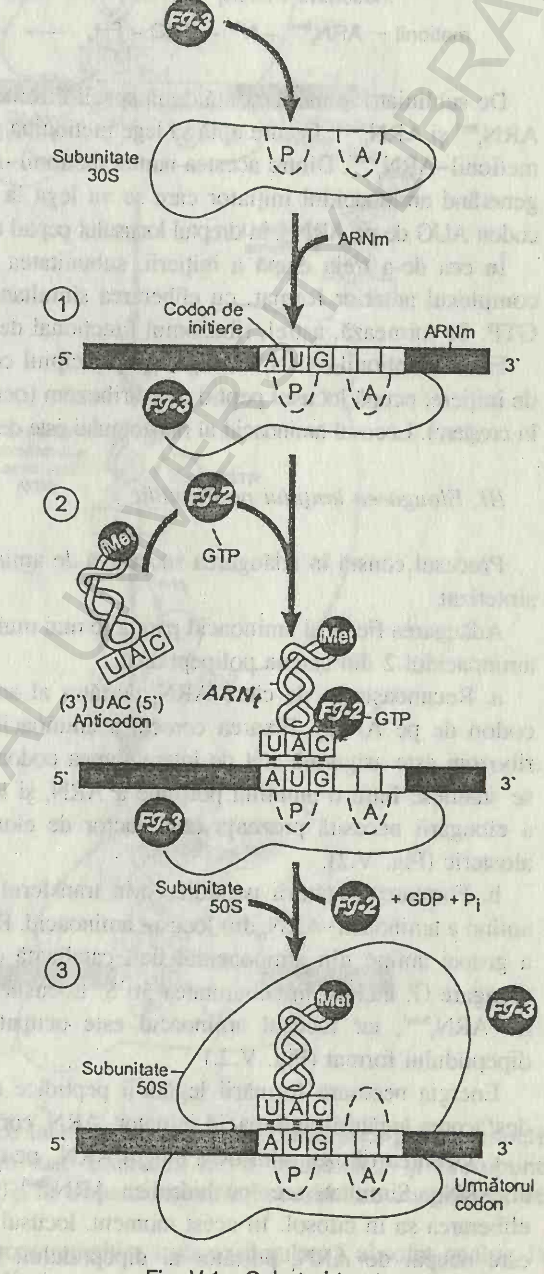


Fig. V.1 - Cele trei trepte în formarea complexului de iniţiere.

format din ARN_t^{fmet} şi metionină, sub acţiunea unei transformilaze având ca donator de grupare formil N^{10}-formiltetrahidrofolatul (N^{10}-CHO-FH_4):

$$\text{metionina} + ARN_t^{fmet} + ATP \longrightarrow \text{metionil}\sim ARN_t^{fmet} + AMP + PP$$

$$\text{metionil} \sim ARN_t^{fmet} + N^{10} - CHO - FH_4 \longrightarrow \text{formil-metionil} \sim ARN_t^{fmet} + FH_4$$

De subliniat faptul că există două specii diferite de ARN_t purtătoare ale metioninei: ARN_t^{met} şi ARN_t^{fmet}, fiecare aptă să lege metionina generând metionil~ARN_t^{met}, respectiv metionil~ARN_t^{fmet}. Dintre acestea numai metionil~ARN_t^{fmet} este susceptibilă la formilare generând aminoacidul iniţiator care se va lega la codonul de iniţiere, şi nu la oricare codon AUG de pe ARN_m, în dreptul locusului peptid de pe ribozom care-l acceptă (Fig. V.1).

În cea de-a treia etapă a iniţierii, subunitatea ribozomală mare, 50 S, se leagă la complexul anterior format, cu eliberarea simultană a factorilor de iniţiere şi hidroliza GTP. Se formează, astfel, ribozomul funcţional desemnat drept complex de iniţiere.

Formil-metionil~ARN_t^{fmet}, legat pe principiul complementarităţii bazelor la codonul de iniţiere, ocupă locusul peptid de pe ribozom (ocupat altfel numai de lanţul polipeptidic în creştere). Locusul aminoacid al ribozomului este deocamdată liber (Fig. V.1).

III. Elongarea lanţului polipeptidic

Procesul constă în adăugarea succesivă de aminoacizi până la formarea proteinei de sintetizat.

Adăugarea fiecărui aminoacid parcurge mai multe etape, ce se vor exemplifica pentru aminoacidul 2 din catena polipeptidică.

a. Recunoaşterea de către ARN_t purtător al aminoacidului doi a celui de-al doilea codon de pe ARN_m. Fixarea corectă a aminoacil~ARN_t pe locusul aminoacid de pe ribozom este asigurată atât de interacţiunea codon-anticodon cât şi de interacţiunile ce se stabilesc între o anumită porţiune a ARN_t şi locusul aminoacid (A). Această etapă a elongării necesită prezenţa unui factor de elongare (Tu) legat la GTP, ca efector alosteric (Fig. V.2).

b. Formarea legăturii peptidice prin transferul restului formil-metionil pe gruparea amino a aminoacil~ARN_t din locusul aminoacid. Reacţia este de fapt o reacţie de acilare a grupei amino din aminoacidul doi, catalizată de o peptidil transferază, factorul de elongare G, inclusă în subunitatea 50 S. Locusul peptid este, în acest moment, ocupat de ARN_t^{fmet}, iar locusul aminoacid este ocupat, nefiresc, de un ARN_t purtător al dipeptidului format (Fig. V.2.)

Energia necesară formării legăturii peptidice este furnizată de energia eliberată la desfacerea legăturii aminoacid iniţiator~ARN_t corespunzător.

c. Glisarea ribozomului de-a lungul ARN_m pe o distanţă de un codon spre capătul 3' al ARN_m. Simultan are loc hidroliza ARN_t^{fmet} (fost purtător al aminoacidului 1) cu eliberarea sa în citosol. În acest moment, locusul peptid, ajuns în dreptul codonului 2, este ocupat de ARN_t purtător al dipeptidului, iar locusul aminoacid, ajuns în faţa codonului 3, este gata să accepte ARN_t purtător al aminoacidului 3 (Fig. V.2). Această

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

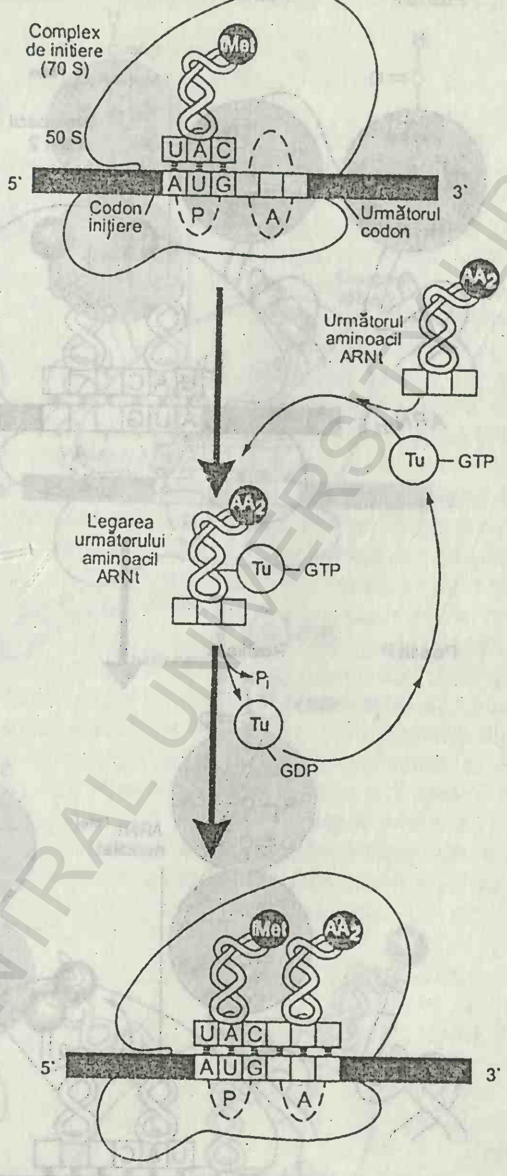


Fig. V.2 - Etapa 1 a elongării.

alunecare a ribozomului pe ARN_m, cu toate evenimentele ce o însoțesc, poartă numele de translocare. Etapa de translocare este catalizată de o translocază și presupune hidroliza unei molecule de GTP. Ca și în etapa anterioară procesul este condiționat de existența unor factori de elongare.

Procesul de elongare este un proces repetitiv, care se derulează absolut analog la formarea următoarelor legături peptidice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

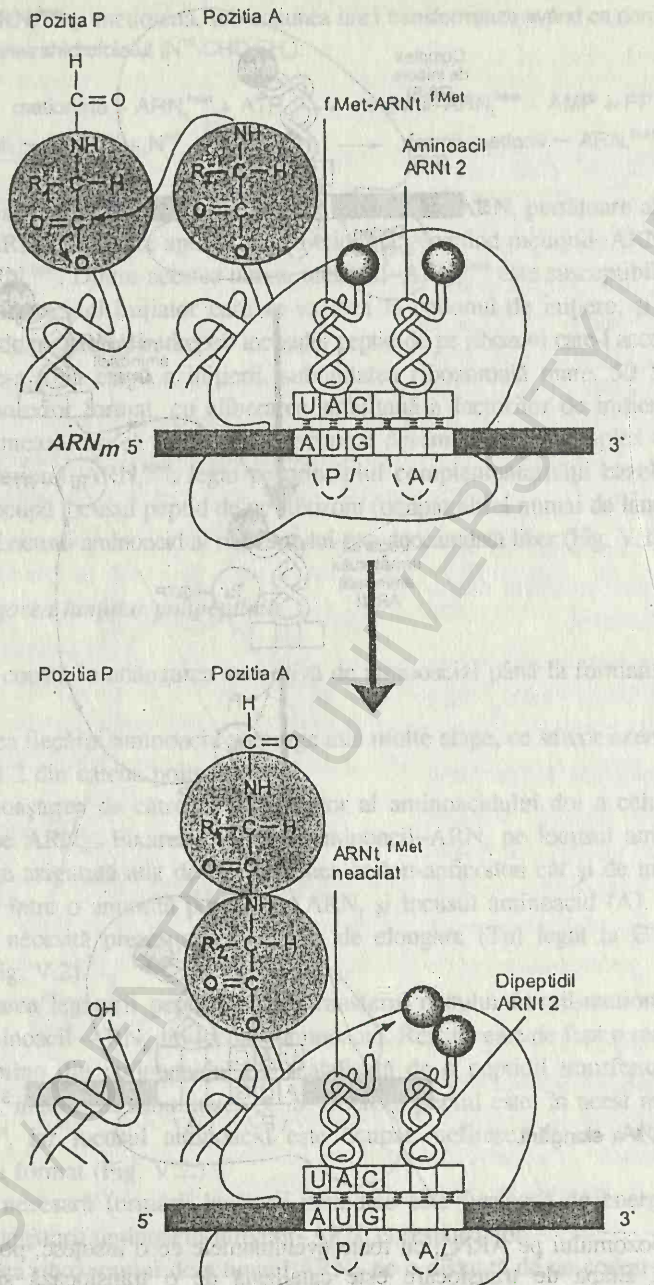


Fig. V. 2a - Etapa 2 a elongării.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

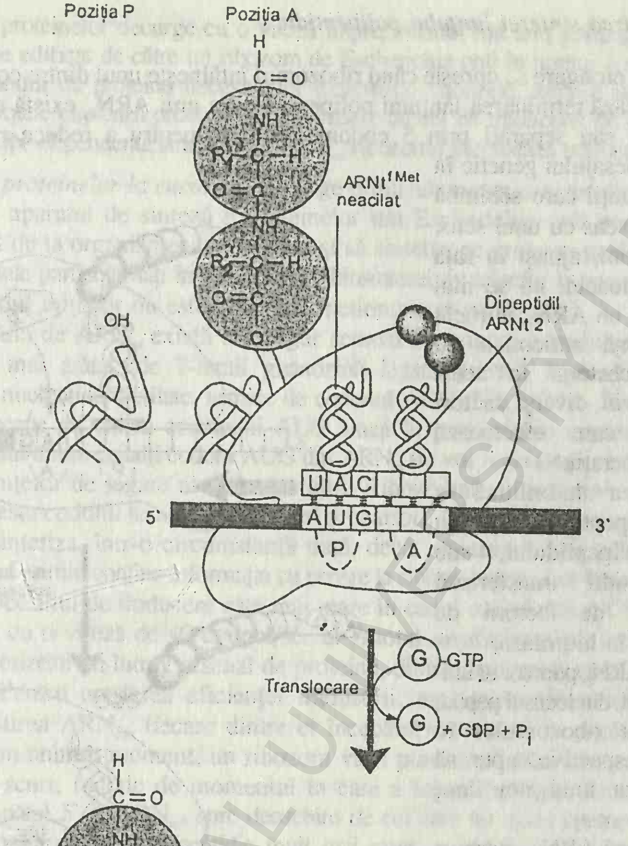


Fig. V.2b - Etapa 3 a elongării.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. Terminarea sintezei lanţului polipeptidic

Procesul de elongare se opreşte când ribozomul întâlneşte unul dintre codonii non sens care semnalizează terminarea lanţului polipeptidic. Pe unii ARN_m există doi codoni non sens succesivi sau separaţi prin 5 codoni, probabil pentru a reduce riscul citirii în continuare a mesajului genetic în cazul unei mutaţii care schimbă un codon non sens cu unul sens. La aceşti codoni, ajunşi în faţa locusului aminoacid, nu se mai poate lega nici un ARN_t, întrucât nici o secvenţă anticodon nu corespunde acestora. În acest moment intervin diverşi factori de eliberare care efectuează următoarele operaţii:

- desfacerea hidrolitică a legăturii polipeptid-ARN_t, cu eliberarea polipeptidului, sub acţiunea peptidil transferazei „transformată“ de factorii de eliberare (FE) în hidrolază;
- eliberarea ARN_t, purtător al ultimului aminoacid, din locusul peptid;
- disocierea ribozomului în subunităţile respective, apte să înceapă sinteza unui nou lanţ polipeptidic;
- degradarea ARN_m care a servit ca matriţă pentru biosinteza unei proteine, atunci când sinteza acesteia nu mai este necesară (Fig. V.3.)

Biosinteza proteinelor este, aşa cum s-a arătat, un proces de mare complexitate care presupune şi un consum energetic substanţial. Într-adevăr, la formarea unei legături peptidice se consumă patru legături macroergice, două în etapa de activare a aminoacizilor (ca ATP) şi două în etapa de elongare (ca GTP). Cele 29 kcal investite în formarea unei legături peptidice care eliberează la hidroliză numai 5 kcal, asigură ireversibilitatea procesului şi, desigur, fidelitatea sa.

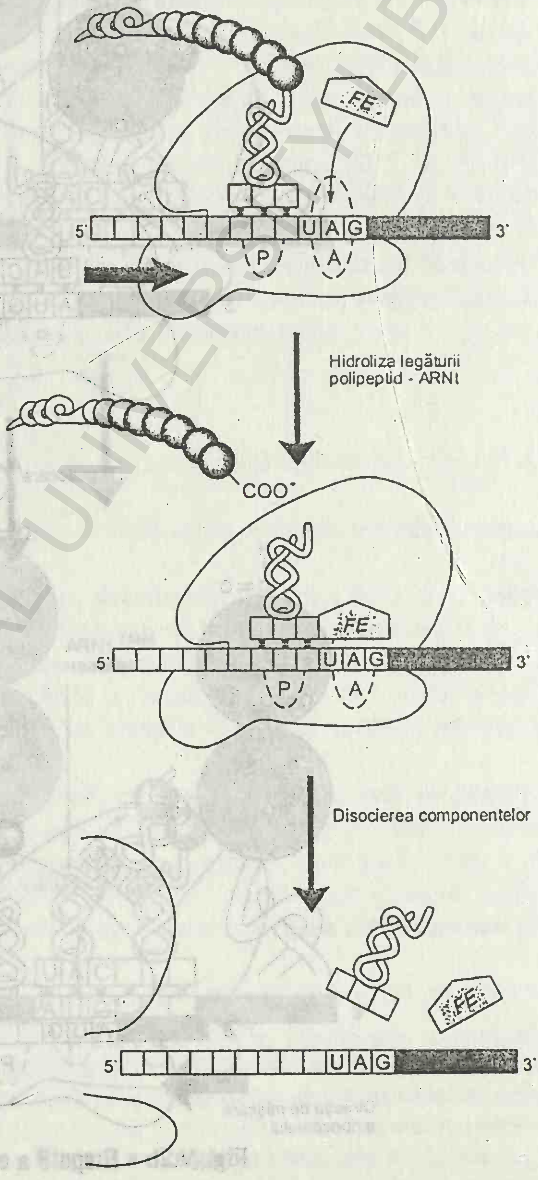


Fig. V.3 - Terminarea lanţului proteic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biosinteza proteinelor decurge cu o viteză impresionantă (un lanţ polipeptidic de 100 de aminoacizi este edificat de către un ribozom de Escherichia coli în numai 5 secunde). Pentru a-şi adecva fondul de proteine necesităţilor extrem de variabile, impuse de fluctuaţiile de mediu, procariotele cuplează procesul de transcriere cu cel de traducere; pe măsură ce ARN polimeraza ADN–dependentă sintetizează ARN_m ribozomii efectuează traducerea acestuia.

Biosinteza proteinelor la eucariote decurge printr-un mecanism similar cu cel propriu procariotelor; aparatul de sinteză a proteinelor din Escherichia coli poate să utilizeze ARN_m obţinut de la organismele superioare şi să sintetizeze proteine perfect funcţionale. Există şi unele particularităţi în desfăşurarea biosintezei proteinelor la eucariote, cum ar fi:

- aminoacidul iniţiator nu este N-formil metionina, ci metionina;
- pe molecula de ARN_m există un singur semnal de iniţiere a traducerii, reprezentat, aşa cum s-a mai arătat, de 7-metil guanozină legată printr-o legătură trifosfat de o succesiune de nucleotide metilate, urmate de codonul AUG (Fig. IV.40). Sinteza proteinelor la eucariote începe cu citirea codonului AUG situat în proximitatea capătului 5' terminal, marcat. Nici unul dintre ceilalţi codoni AUG din ARN_m nu vor servi drept codoni de iniţiere, datorită exigenţelor de legare ale ribozomului. Ribozomul eucariot mai are un atribut: el nu „sare" peste codonii terminatori (ca cel procariot). Ca urmare, pe un ARN_m eucariot nu se poate sintetiza, într-o circumstanţă dată, decât un singur lanţ polipeptidic, chiar când transcriptul primar conţine informaţia cu privire la sinteza mai multor lanţuri polipeptidice.
- viteza procesului de traducere este mai mare în cazul eucariotelor. Citirea ARN_m de către ribozom cu o viteză de 40 codoni/sec ar fi total insuficientă pentru eucariote care trebuie să sintetizeze un întreg arsenal de proteine, dintre care unele cu masa moleculară foarte mare. Pentru creşterea eficienţei traducerii, mai mulţi ribozomi se angajează simultan în citirea ARN_m, fiecare dintre ei începând citirea de la capătul 5' terminal. Evident, într-un anumit moment, un ribozom va fi purtătorul unui lanţ polipeptidic mai lung sau mai scurt, funcţie de momentul în care a început citirea. Ribozomii cei mai apropiaţi de capătul 5' al ARN_m, spre deosebire de cei care au ajuns aproape de capătul 3' terminal, vor purta un lanţ polipeptidic mult mai scurt, având încă de „descifrat" o mare porţiune de ARN_m. Asocierea mai multor ribozomi, ce traduc sincron aceeaşi moleculă de ARN_m, constituie un poliribozom sau polizom (Fig. V.4.) Se pare că şi procariotele recurg la formarea polizomilor.

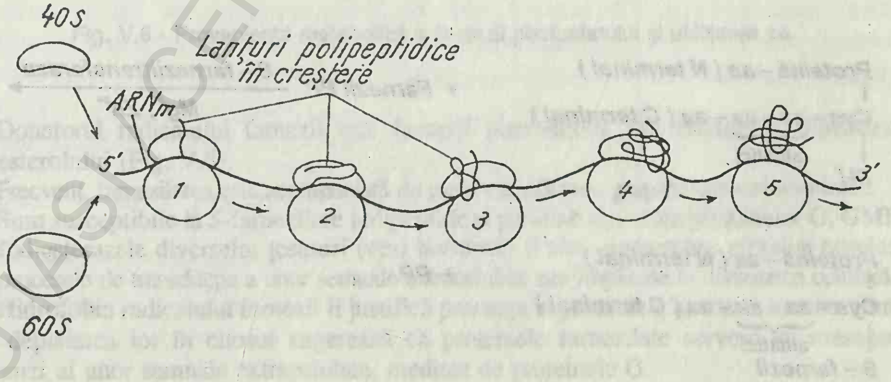


Fig. V.4 - Ilustrarea schematică a unui poliribozom.

V.3. PRELUCRĂRI POSTTRADUCERE ALE MOLECULELOR PROTEICE

Obţinerea unei proteine native, funcţionale, presupune, cel mai adesea, modificarea lanţului polipeptidic rezultat prin traducere. Prelucrările posttraducere constau în:

- îndepărtarea enzimatică de la capătul N-terminal a restului formil din formil-metionină (la procariote) sau a metioninei (la eucariote), ceea ce explică faptul că nu toate proteinele încep cu aceşti aminoacizi;
- modificarea unor aminoacizi în scopul obţinerii celor care nu dispun de cuvinte cod. Hidroxiprolina, hidroxilizina din colagen se obţin prin hidroxilarea enzimatică a prolinei, respectiv lizinei. Cistina se formează prin oxidarea reziduurilor de cisteină. γ-carboxilarea reziduurilor de acid glutamic din unele proteine, îndeosebi a celor implicate în coagulare, generează γ-carboxi-glutamat, excelent chelator al calciului. Reacţia este dependentă de vitamina K.
- iodurarea reziduurilor de tirozină ale tireoglobulinei;
- ataşarea la lanţul polipeptidic a unor grupări funcţionale, de exemplu fosfat, pentru formarea fosfoproteinelor (fosforilarea reziduurilor de serină a unor enzime reglatoare sau a reziduurilor de serină, treonină, tirozină din cazeină), glicozil, pentru formarea glicoproteinelor, biotină, pentru acetil-CoA carboxiligaza etc.
- clivarea unor oligopeptide în cazul unor proteine sintetizate ca precursori. De exemplu, insulina sintetizată ca preprohormon este convertită la hormon numai după îndepărtarea succesivă a unor fragmente polipeptidice (vezi insulina).
- ADP-ribozilarea (mono- sau poli- ADP-ribozilarea) proteinelor, întâlnită la eucariotele superioare, joacă un rol central în procesele de reparare, diferenţiere celulară, carcinogeneză.

Mono ADP-ribozilarea reprezintă o modalitate de acţiune a unor toxine bacteriene printre care toxina difterică a holerei etc. care îşi aleg, inspirat, ţinta printre proteinele implicate în transducţia unor semnale celulare.

Sursa de ADP riboză este NAD^+.

- S-farnezilarea

O prelucrare posttraducere, recent relevată, este S-farnezilarea proteinelor. Procesul se adresează, în special, polipeptidelor sau proteinelor având la capătul carboxi-terminal secvenţa: cisteină-(aminoacid alifatic)$_2$-aminoacid C-terminal şi constă în S-farnezilarea restului cisteinil catalizată de o S-farnezil transferază (fig. V.5).

Proteină – aa (N terminal)
Cys – aa – aa – aa (C terminal) (aa – aa: *alifatici*)
SH

+ Farnezil PP —— *S – farneziltransferaza*; *Mg^{2+}, Zn^{2+}* ——→

Proteină – aa (N terminal)
Cys – aa – aa – aa (C terminal) (aa – aa: *alifatici*)
S – farnezil

+ PP

Fig. V.5 - S - farnezilarea proteinelor

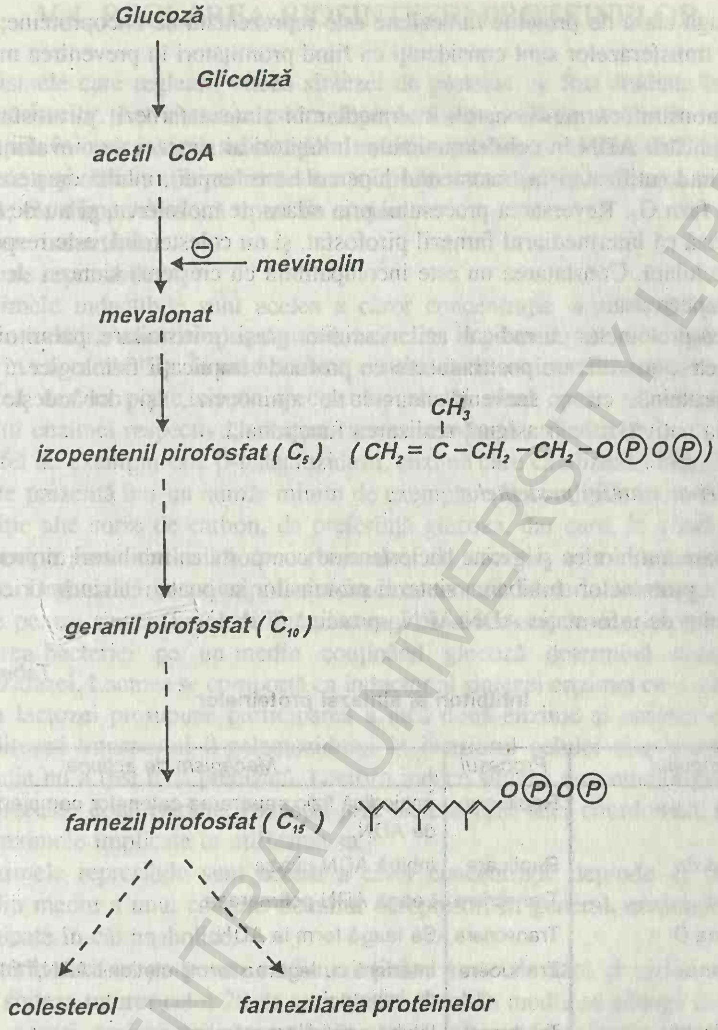


Fig. V.6 - Provenienţa metabolică a farnezil pirofosfatului şi utilizarea sa.

Donatorul radicalului farnezil este farnezil pirofosfatul, intermediar în biosinteza colesterolului (Fig. V.6).

Frecvent, farnezilarea este acompaniată de metil esterificarea grupării carboxi-terminale.

Sunt susceptibile la S-farnezilare polipeptide şi proteine din clasa proteinelor G, GMP_c fosfodiesterazele diverselor ţesuturi (vezi hormoni) şi alte numeroase proteine corelate cu procesele de transducţie a unor semnale extracelulare sau implicate în diviziunea celulară.

Hidrofobia radicalului farnezil îi justifică prezenţa în proteinele ancorate la membrane iar depistarea lor în citosol sugerează că proteinele farnezilate servesc ca mesageri secunzi ai unor semnale extracelulare, mediate de proteinele G.

O întreagă clasă de proteine farnezilate este reprezentată de oncoproteine; inhibitori ai farnezil transferazelor sunt consideraţi ca fiind promiţători în prevenirea malignizării celulare.

S-a demonstrat că mevalonatul, intermediar în sinteza farnezil pirofosfatului, este necesar replicării ADN în celulele animale. Inhibitori ai sintezei de mevalonat, cum ar fi mevinolinul (utilizat şi în tratamentul hipercolesterolemiei), inhibă creşterea blocând celulele în faza G_1. Reversarea procesului prin adaos de mevalonat, şi nu de colesterol, demonstrează că intermediarul farnezil pirofosfat, şi nu colesterolul, este responsabil de creşterea celulară. Constatarea nu este incompatibilă cu creşterea sintezei de colesterol în celula canceroasă.

- acilarea proteinelor cu radicali acil ai acizilor graşi (miristoilare, palmitoilare) este, de asemenea, o modificare posttraducere cu profunde implicaţii fiziologice.

Orice proteină, cu o secvenţă anume de aminoacizi, îşi dobândeşte, ulterior, conformaţia nativă, care îi asigură realizarea funcţională.

Inhibitori ai sintezei proteinelor

Numeroase antibiotice şi toxine bacteriene se comportă ca inhibitori ai procesului de biosinteză a proteinelor. Inhibarea sintezei proteinelor se poate realiza în orice moment al transferului de informaţie ADN-ARN_m-proteină (Tabel V.2).

Tabelul V.2.

Inhibitori ai sintezei proteinelor

Compusul	*Procesul*	*Mecanism de acţiune*
Mitomicina	Replicare	Împiedică fizic separarea catenelor complementare de ADN.
Acidul nalidixic	Replicare	Inhibă ADN giraza
Rifampicina	Transcriere	Leagă ARN polimeraza.
Actinomicina D	Transcriere	Se leagă ferm la ADN.
Streptomicina	Traducere	Interferă cu legarea formil-metionil-ARN_t^{fmet} la locul de iniţiere.
Cloramfenicolul	Traducere	Inhibă peptidil-transferaza
Tetraciclina	Traducere	Inhibă legarea aminoacil-ARN_t la ribozomi.
Eritromicina	Traducere	Inhibă translocarea prin legare la subunitatea 50 S.
Puromicina	Traducere	Blochează elongarea, substituindu-se unui amino-acil-ARN_t în situsul A (este analog structural al extremităţii 3' al tirozil-ARN_t)
Neomicina, Kanamicina	Traducere	Erori în citirea codului genetic
Toxina difterică	Traducere	Inhibă translocaza

Deşi acţiunea compuşilor menţionaţi se manifestă, cu precădere, în organismele procariote, unele sunt la fel de active şi în cele eucariote (puromicina, actinomicina D, α-amanitina).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V.4. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Mecanismele care reglează viteza sintezei de proteine au fost studiate în special în cazul procariotelor. Activitatea acestora depinde foarte mult de mediul în care trăiesc, de fluctuaţiile în concentraţia substanţelor nutritive pe care le utilizează. Procariotele au abilitatea de a-şi adecva echipamentul enzimatic la natura surselor de azot sau carbon ce li se oferă; ele dispun de două tipuri de enzime:

a. enzime inductibile;

b. enzime represibile.

a. Enzimele inductibile sunt acelea a căror concentraţie depinde de prezenţa sau absenţa din mediu a unui compus denumit inductor. În general, enzimele inductibile sunt implicate în căi catabolice. În mod normal, cantitatea de enzime inductibile în celule este foarte mică dar ea poate creşte spectaculos atunci când apare necesitatea utilizării substratului enzimei respective, substrat care se comportă ca inductor.

Un astfel de exemplu este β-galactozidaza, enzimă care catalizează hidroliza lactozei şi care este prezentă într-un număr minim de exemplare în condiţiile în care bacteria are la dispoziţie alte surse de carbon, de preferinţă glucoza, dar care, în condiţiile în care lactoza devine sursa exclusivă de carbon, deci de energie, este sintetizată în mii de exemplare. Organizată pe principiul maximei economii, bacteria investeşte aminoacizi şi energie pentru sinteza enzimei numai atunci când aceasta devine imperios necesară. Transferarea bacteriei pe un mediu conţinând glucoză determină sistarea sintezei β-galactozidazei. Lactoza se comportă ca inductor al sintezei enzimei ce o catabolizează. Utilizarea lactozei presupune participarea a încă două enzime şi anume: o permează, care facilitează transportul β-galactozidului în interiorul celulei şi o transacetilază, a cărei funcţie nu a fost încă precizată. Lactoza induce sinteza nu numai a galactozidazei ci şi a celorlalte două enzime. Inducţia prin lactoză este deci coordonată, referindu-se la toate enzimele implicate în utilizarea sa.

b. Enzimele represibile sunt acelea a căror concentraţie depinde de prezenţa sau absenţa din mediu a unui compus denumit corepresor. În general, enzimele represibile sunt implicate în căi anabolice.

O bacterie care creşte pe un mediu conţinând surse de azot şi carbon este aptă să realizeze sinteza tuturor celor 20 de aminoacizi. Dacă în mediu se adaugă unul – oricare – dintre aceşti aminoacizi, bacteria încetează să producă enzimele implicate în biosinteza aminoacidului respectiv. Aminoacidul adăugat produce represia sintezei tuturor enzimelor implicate în biosinteza sa. Represia prin produsul final al unei căi anabolice este deci o represie coordonată.

Explicarea în termeni moleculari a proceselor de inducţie şi represie enzimatică se datorează lucrărilor lui Jacob şi Monod. În 1961, aceştia elaborează modelul privind reglarea biosintezei proteinelor la procariote, reglare ce se efectuează la nivelul transcrierii, deci a sintezei ARN_m.

Modelul Jacob-Monod de reglare a biosintezei proteinelor poartă numele de teoria operonului şi s-a bazat, în principiu, pe studiul reglării metabolismului lactozei în Escherichia coli. Ei au postulat că genele structurale ce conţin informaţia cu privire la biosinteza β-galactozidazei, permeazei şi transacetilazei (desemnate z,y,x) sunt adiacente în genom şi că viteza sintezei celor trei enzime este guvernată de un fragment de ADN

denumit genă reglatoare. Pe această genă reglatoare se edifică un ARN_m ce conţine informaţia pentru sinteza unei proteine denumită represor. Acest represor, o proteină alosterică, se leagă la un fragment de ADN, desemnat drept operator, care este adiacent la genele structurale a căror transcriere o controlează şi împreună cu care formează un operon (operonul lac). Genele structurale ale operonului pot fi transcrise atâta timp cât operatorul este liber. Legarea represorului la operator blochează accesul ARN polimerazei la locusul promotor având ca rezultat suprimarea transcrierii genelor structurale interesate în metabolizarea lactozei.

Ce se întâmplă în prezenţa lactozei care, aşa cum am văzut, se comportă ca inductor, declanşând sinteza celor trei enzime ce o catabolizează? Jacob şi Monod admit că inductorul se leagă specific la represorul ataşat la operator şi, inducând o tranziţie alosterică, îl converteşte la o conformaţie cu afinitate redusă pentru operator; ca urmare, are loc desprinderea acestuia de pe operator. În această situaţie, ARN polimeraza se leagă nestânjenită la locusul promotor, iniţiind transcrierea genelor structurale, respectiv sinteza unui ARN_m policistronic pe care se vor edifica cele trei enzime ce catabolizează lactoza (Fig. V.7). Inductorul realizează derepresia operonului şi permite declanşarea proceselor de transcriere şi traducere subsecvente. Moleculele de represor libere pot lega şi ele molecule de inductor, ceea ce le converteşte la forme inapte să se lege la operator.

Abilitatea represorului de-a se lega reversibil şi exclusiv la operator sau inductor este responsabilă atât de represia sistemului β-galactozidază cât şi de derepresia (inducţia) sa.

O întrebare pare inevitabilă: ce se întâmplă dacă bacteria (E.coli) dispune simultan de glucoză şi lactoză? Se va comporta lactoza ca inductor, împiedicând acţiunea represorului şi deci permiţând transcrierea genelor lac şi ulterioara lor traducere? Strategia bacteriei este alta; ea creşte pe seama glucozei şi numai atunci când concentraţia acesteia atinge valori minime începe să utilizeze lactoza. Metabolizarea simultană a glucozei, combustibil preferat al E.coli, şi a lactozei sunt excluse; bacteria nu consumă energie pentru sinteza enzimelor operonului lac atâta timp cât dispune de glucoză (represie prin catabolit). Cum „simte" bacteria prezenţa glucozei în mediu şi cum se comută activitatea ei pe utilizarea lactozei când concentraţia glucozei scade? Răspunsul s-a conturat ca urmare a următoarelor constatări:

- adenozin monofosfatul ciclic (AMP_c), format din ATP sub acţiunea adenilatciclazei şi hidrolizat de fosfodiesterază, reprezintă semnalul de foame al bacteriei ("hunger signal"), de lipsă a glucozei. AMP_c se leagă la o proteină receptoare specifică (proteina receptoare a AMP_c = $P.R.AMP_c$), formând complexul AMP_c-$PRAMP_c$, apt să se lege pe un locus specific din regiunea promotor. Prezenţa complexului în acest locus favorizează accesul şi legarea ARN polimerazei la promotor (locusul promotor se suprapune parţial peste locusul operator).

- în lipsa glucozei sau la concentraţii mici ale acesteia, concentraţia AMPc este mare; formarea complexelor cu proteina receptoare şi legarea acesteia la promotor permite intrarea ARN-polimerazei la locusul promotor. Dacă lactoza este prezentă în mediu, operatorul este liber şi ARN polimeraza efectuează transcrierea genelor lac. (β-galactozidaza, permeaza, transacetilaza) şi deci utilizarea lactozei (Fig. V. 8).

Atunci când concentraţia glucozei este mare, concentraţia AMPc este redusă şi, prin absenţa complexului AMP_c-$P.R.AMP_c$, ARN polimeraza nu se leagă la promotor şi genele lac nu sunt transcrise fie că există lactoză, fie că nu, deci indiferent dacă operatorul este ocupat de represor.

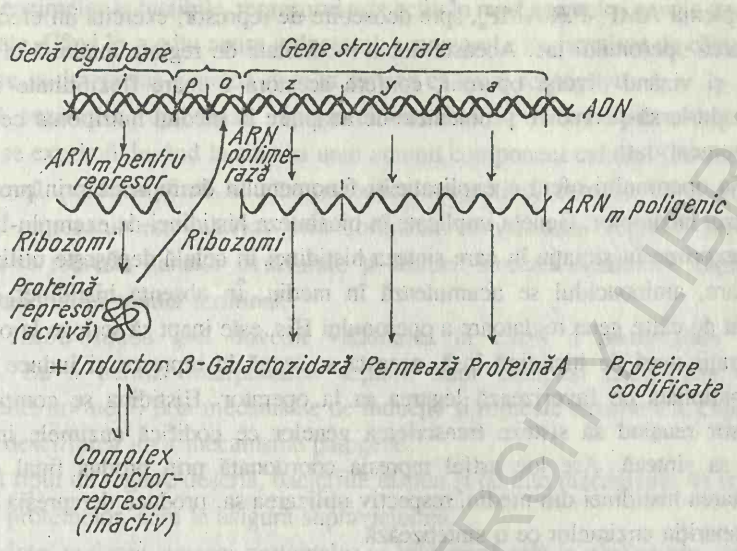


Fig. V.7 - Ilustrarea mecanismului de reglare a biosintezei proteinelor prin inducţie.

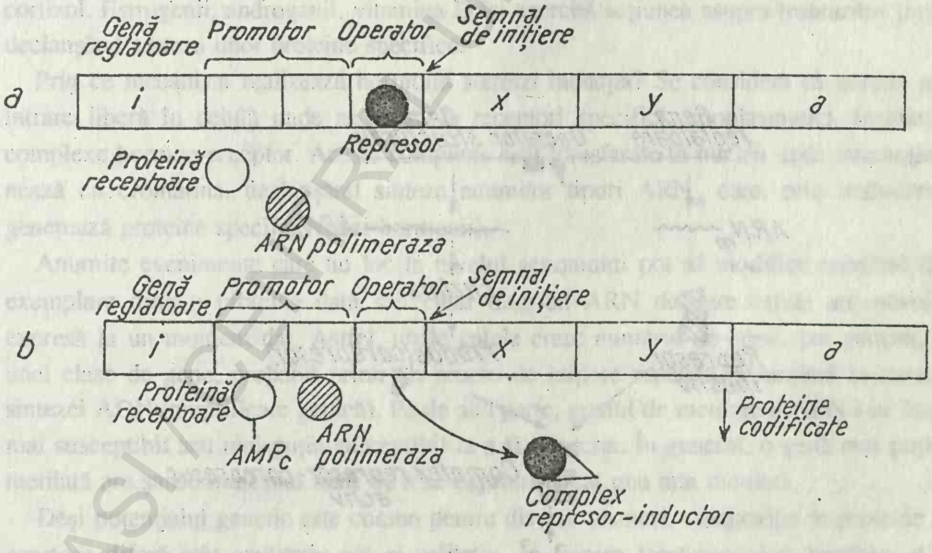


Fig. V.8 - Reglarea operonului lac la E.Coli într-un mediu conţinând glucoză (a) sau lactoză (b).

Complexul AMP_c-P.R.AMP_c, spre deosebire de represor, exercită un efect pozitiv în exprimarea operonului lac. Această dublă modalitate de reglare întâlnită la numeroase bacterii şi vizând diverşi operoni, conferă acestora o mare flexibilitate metabolică, permiţându-le să-şi rezolve problemele de adaptare la mediul nutriţional ce li se oferă la un moment dat.

Teoria operonului oferă o explicaţie şi fenomenului de represie prin produs final a biosintezei enzimelor. Genele implicate în biosinteza histidinei-de exemplu-încetează să se mai exprime în situaţia în care sinteza histidinei în celulă depăşeşte utilizarea sa şi, ca urmare, aminoacidul se acumulează în mediu. În absenţa histidinei, represorul, sintetizat de către gena reglatoare a operonului His, este inapt să se lege la operator. La concentraţii mari de histidină însă, aceasta se leagă la represor şi induce o tranziţie conformaţională ce favorizează legarea sa la operator. Histidina se comportă ca un corepresor reuşind să sisteze transcrierea genelor ce codifică enzimele implicate în propria sa sinteză. Are loc astfel represia coordonată prin produs final (Fig. V.9). Îndepărtarea histidinei din mediu, respectiv utilizarea sa, produce derepresia transcrierii şi deci apariţia enzimelor ce o sintetizează.

În termeni generali, modelul Jacob-Monod admite existenţa unei gene reglatoare care controlează exprimarea anumitor gene structurale prin intermediul unei proteine, a cărei sinteză o specifică, denumită represor. Activarea represorului suprimă sinteza de ARN_m, deci de proteine, în timp ce inactivarea sa permite transcrierea genelor structurale controlate şi sinteza proteinelor respective.

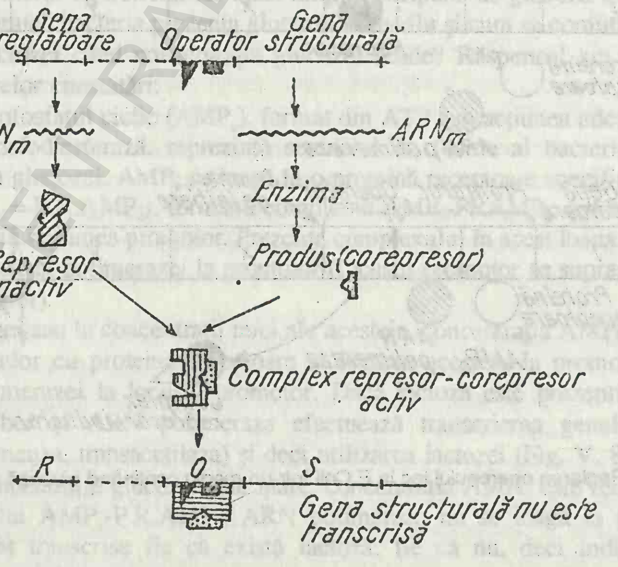


Fig. V.9. - Ilustrarea mecanismului de reglare a biosintezei proteinelor prin represie.

În cazul enzimelor inductibile, represorul este activ în mod normal şi genele structurale sunt represate. Când în mediu apare inductorul, represorul este inactivat de către acesta, ceea ce duce la derepresia genelor, deci la sinteza enzimei respective.

În cazul enzimelor represibile, represorul este inactiv în mod normal şi genele structurale se exprimă ducând la sinteza unui anumit component celular. Când în mediu se acumulează produsul final al căii anabolice respective, care se comportă drept corepresor, represorul este activat prin formarea complexului represor-corepresor, producându-se represia genelor structurale şi sistarea sintezei enzimelor implicate în sinteza metabolitului celular terminal.

Ipoteza Jacob-Monod şi-a dovedit validitatea în cazul a nenumărate sisteme enzimatice. Ea a permis interpretarea acţiunii unor compuşi endo- sau exogeni (medicamente, hormoni) prin mecanisme de inducţie şi represie enzimatică, contribuind totodată la descifrarea unor mecanisme patogene.

Pe lângă tipul de reglare descris, bacteriile dispun şi de alte mecanisme de control al biosintezei proteinelor, care le asigură supravieţuirea.

La eucariote, reglarea sintezei proteinelor se realizează atât la nivelul transcrierii cât şi la nivelul traducerii. Mecanismele reglării la eucariote sunt puţin cunoscute.

Reglarea la nivelul transcrierii se realizează prin acţiunea unor hormoni. Se ştie, de exemplu, că sinteza unor enzime implicate în gluconeogeneză, cum ar fi: piruvat carboxiligaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza, fructozo-1,6-bisfosfataza, este indusă de cortizol. Estrogenii, androgenii, vitamina D îşi exercită acţiunea asupra ţesuturilor ţintă declanşând sinteza unor proteine specifice.

Prin ce mecanism realizează hormonii steroizi inducţia? Se consideră că aceştia au intrare liberă în celulă unde se leagă la receptori specifici, citoplasmatici, formând complexe hormon-receptor. Aceste complexe sunt transferate în nucleu unde interacţionează cu cromatina, declanşând sinteza anumitor tipuri ARN_m care, prin traducere, generează proteine specifice (vezi hormonii).

Anumite evenimente care au loc la nivelul genomului pot să modifice numărul de exemplare dintr-o proteină dată sau chiar dintr-un ARN de care celula are nevoie expresă la un moment dat. Astfel, unele celule cresc numărul de copii, per genom, a unei clase de gene, probabil printr-un proces de iniţiere repetată decurgând în cursul sintezei ADN (amplificare genică). Pe de altă parte, gradul de metilare a ADN l-ar face mai susceptibil sau mai puţin susceptibil la a fi transcris. În general, o genă mai puţin metilată are şanse mult mai mari de a se exprima decât una mai metilată.

Deşi potenţialul genetic este comun pentru diverse ţesuturi, compoziţia în proteine a acestora diferă atât cantitativ cât şi calitativ. În fiecare ţesut numai o fracţiune din informaţia genetică este tradusă sub formă de proteine. Ţinând seama de mărimea genomului eucariot şi de faptul că nu mai mult decât 10% din acesta este vreodată

transcris şi apoi exprimat în proteine, se consideră că reglarea transcrierii la eucariote s-ar face mai degrabă prin proteine activatoare ale genelor şi nu prin proteine represoare.

Reglarea la nivelul traducerii poate fi exemplificată în cazul biosintezei hemoglobinei în extracte de reticulocite. Adaosul de hem la acestea declanşează biosinteza globinei; suprimarea aportului de hem sistează sinteza. Controlul s-ar exercita asupra unuia dintre factorii de iniţiere şi anume factorul de iniţiere-2 (FI-2). Acesta poate trece reversibil dintr-o formă defosfo, activă, într-o formă fosfo, inactivă. Această modificare covalentă a FI-2 este realizată de o proteinkinază AMP_c dependentă, enzimă constituită din două subunităţi reglatoare şi două subunităţi catalitice cu activitate kinazică (C_2R_2). Sub acţiunea AMP_c, proteinkinaza (C_2R_2) se disociază cu eliberarea subunităţilor catalitice active, care fosforilează FI-2 trecându-l în forma fosfo- inactivă. Deosebit de important este faptul că protein kinaza AMP_c dependentă este inhibată de hem. Dacă hemul este prezent în probă, proteinkinaza este inactivă şi FI-2 rămâne în forma defosfo-activă, permiţând iniţierea sintezei globinei. În absenţa hemului, inhibiţia proteinkinazei se suprimă şi ca atare ea va fosforila FI-2 inactivându-l deci oprind sinteza globinei. Conversia formelor fosfo- la defosfo- este realizată de către o fosfatază (Fig. V. 10.)

Reglarea biosintezei proteinelor la eucariote presupune şi alte mecanisme, a căror bază moleculară este încă neclarificată.

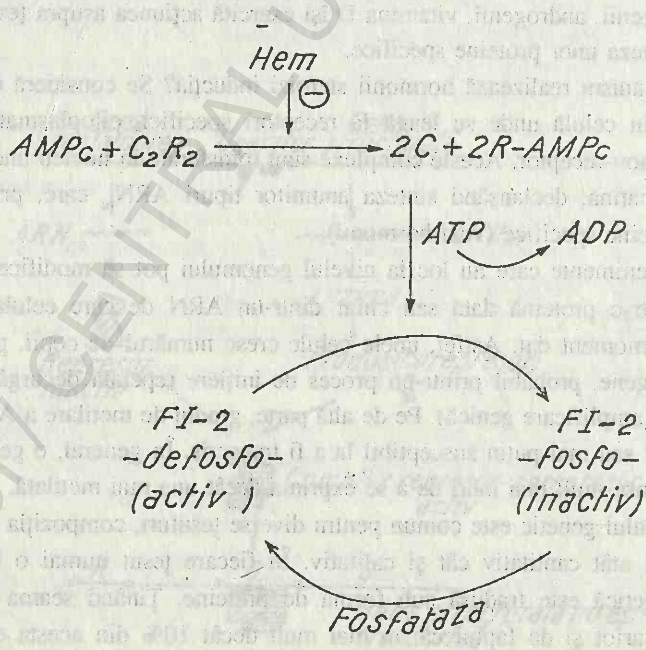


Fig. V.10 - Reglarea biosintezei globinei prin fosforilare reversibilă a FI_2.

V.5. LEZIUNI ALE MOLECULELOR DE ADN ŞI REPARAREA ACESTORA. MUTAŢII

Stabilitatea informaţiei genetice înscrisă în molecula de ADN este esenţială pentru organisme în sine şi pentru continuitatea lor în timp.

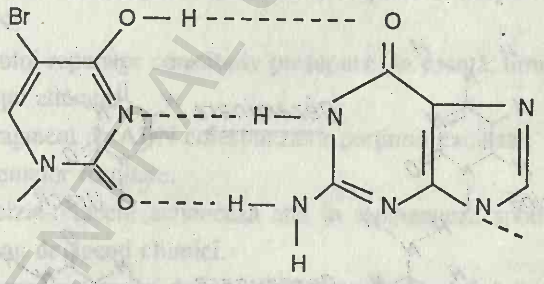
Cum mediul în care trăiesc acestea poate fi advers, există riscul ca integritatea informaţiei genetice să fie ameninţată.

Vulnerabilitatea moleculei de ADN la factori chimici (agenţi alchilanţi, agenţi de intercalare, agenţi de nitrozare, analogi structurali, acizi, cum ar fi acidul azotos, compuşi care prin metabolizare generează radicali liberi) şi fizici (radiaţii ultraviolete, X) creează premiza apariţiei „leziunilor" ADN.

Leziuni ale ADN pot fi introduse şi în cursul replicării, dacă acestea au scăpat acţiunii de corector (proof reading) a ADN polimerazei III (mismatch errors).

Leziunile pe care le suferă materialul genetic constau, în principal, din:

- schimbarea stărilor tautomere, cu posibilitatea împerecherii eronate a bazelor, fie în cursul replicării, fie prin substituirea unei baze proprii ADN cu un analog structural; astfel, 5 brom-uracilul, analog al timinei, preferă forma enolică şi nu pe cea cetonică, pe care o adoptă timina; din acest motiv 5 brom-uracilul se împerechează cu G şi nu cu A:



Forma enolică a 5-Br - uracilului

Guanina

Consecinţa este înlocuirea perechii A = T cu G ≡ C (tranziţie).

- depurinări; aproximativ 5000 de baze purinice se pierd pe zi prin hidroliza spontană a legăturii glicozidice;
- ruperea legăturilor fosfat diesterice;
- cross-linking al bazelor de pe catene opuse;
- dezaminarea spontană sau sub acţiunea acidului azotos, cu formarea unor compuşi care fie nu se împerechează cu bazele azotate, fie sunt susceptibili la împerecheri eronate.

Prin dezaminare citozina conduce la uracil, guanina la xantină şi adenina la hipoxantină (Fig. V.11); fiecare dintre ele, nefiind baze proprii ADN, vor fi cu uşurinţă recunoscute şi excluse de către enzimele de reparare (se admite că existenţa timinei în loc de uracil în molecula ADN şi-ar găsi astfel justificarea);

- dimerizarea timinei, cu formarea unor structuri ciclobutanice în cadrul aceleiaşi catene (Fig. V.12);

- inserţia uneia sau a mai multor baze suplimentare; se produc inserţii la tratarea unor culturi celulare cu acridină, moleculă plană care se poate intercala între două baze dintr-un lanţ, fără să se lege covalent. În timpul replicării, pe catena complementară se inseră, corespunzător acridinei, o bază suplimentară care se leagă covalent. La o replicare ulterioară va exista o pereche de baze suplimentară;

- deleţia uneia sau a mai multor baze; se produc deleţii prin hidroliza unei baze din lanţ, posibilă la variaţii de pH şi temperatură, sau prin acţiunea unor agenţi care modifică o bază de aşa natură încât aceasta nu mai este complementară cu nici o altă bază. Prin replicare, „golul" apare pe ambele catene.

Aceste leziuni pot fi corectate de mecanismele de reparare pe care le-a imaginat natura. Gama extrem de variată a leziunilor, rezultând din greşeli apărute în cursul replicării, ca şi din agresiuni externe asupra moleculei, implică o mare diversitate a mecanismelor de reparare.

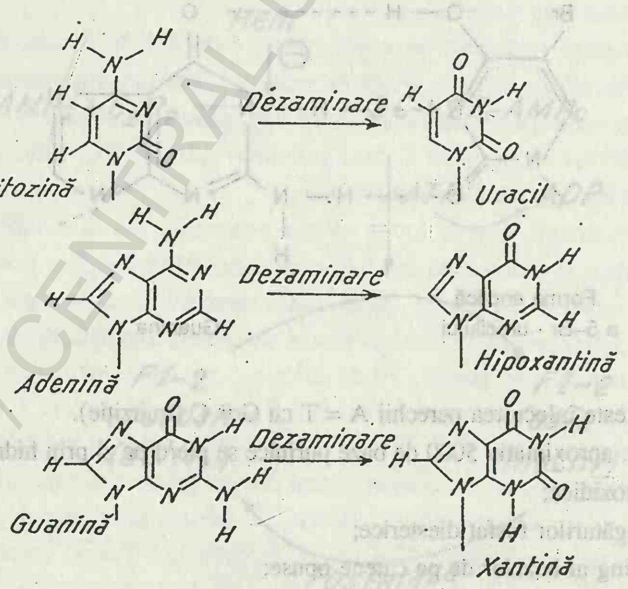
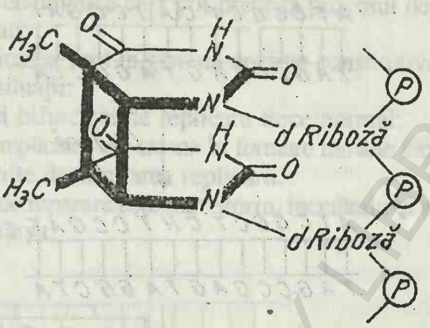


Fig. V.11 - Dezaminarea duce la baze "străine" ADN

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. V.12 - Dimeri de timină.



V.5.1. REPARAREA PRIN EXCIZIE-RESINTEZĂ

Molecula de ADN este singura macromoleculă care poate fi reparată (cu maximă acurateţe), atribut decurgând din redundanţa informaţiei, intrinsecă structurii dublu helicoidale; ori de câte ori o catenă este lezată cealaltă va servi nu numai la păstrarea informaţiei genetice, dar şi la repararea catenei lezate. Esenţiale în procesul de reparare sunt detectarea leziunii şi corectarea acesteia. Numeroase enzime (peste 50) conlucrează în aceste procese de recunoaştere specifică şi reparare, „supraveghind" continuu moleculele de ADN.

Acţiunea sistemului reparator constitutiv presupune, în esenţă, următoarele etape:

- excizia secvenţei alterate;
- sinteza unui fragment de ADN corespunzător porţiunii excizate;
- sudarea fragmentelor rezultate.

Sistemul de excizie-refacere acţionează atât în mutageneza spotană, cât şi în cea indusă de radiaţii sau de agenţi chimici.

Vom ilustra acţiunea sistemului de reparare în situaţia dezaminării uneia dintre bazele azotate (Fig. V.13).

Eliminarea bazelor rezultate se realizează sub acţiunea unor glicozidaze specifice care recunosc legătura glicozidică purtătoare a unei baze alterate.

Endonucleaze specifice recunosc riboza neangajată în legătură glicozidică şi clivează legăturile fosfat diesterice dintr-un fragment de ADN ce delimitează „golul" lăsat prin eliminarea bazei.

ADN polimeraza I efectuează, folosind ca matriţă catena de ADN „bună", o copie a fragmentului de ADN excizat.

ADN ligaza ligaturează fragmentele de ADN în prezenţa ATP.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

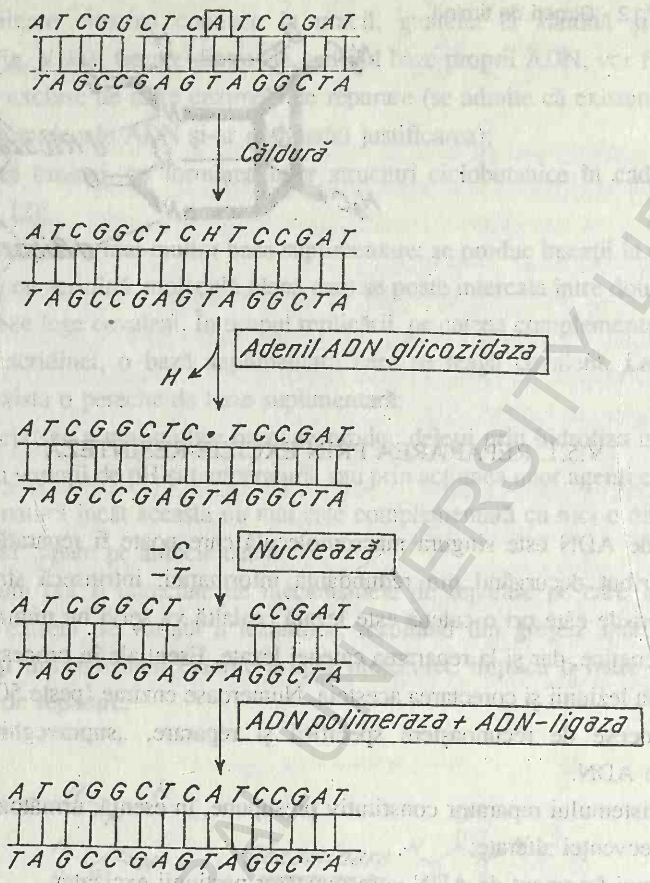


Fig. V.13 - Repararea unei catene ADN în care a avut loc dezaminarea adeninei la hipoxantină

Un alt exemplu de acţiune a sistemului constitutiv reparator îl reprezintă excizia dimerilor de timină formaţi prin acţiunea radiaţiilor UV (Fig. V.14). Defecte în activitatea enzimelor de reparare se traduc printr-o mare sensibilitate la acţiunea radiaţiilor UV şi o frecvenţă crescută a cancerelor de piele.

Împerecherea greşită a bazelor în cursul replicării (mismatches), scăpată vigilenţei ADN polimerazei III, este rezolvată de un sistem de reparare specializat care sesizează distorsiunile introduse în dublul helix, discriminând totodată între catena nou sintetizată (încă nemetilată specific) şi catena parentală.

Pe lângă sistemul constitutiv de reparare, organismele dispun de un sistem inductibil de reparare, reprezentat de o serie de factori de natură proteică, a căror fidelitate în replicare este numai aproximativă şi care, din acest motiv, a fost denumit „sistemul reparator predispus la erori". Cum el condiţionează supravieţuirea, făcând posibilă replicarea ADN, chiar dacă prin reparări oarecum aproximative, a fost denumit şi sistem SOS.

BOOK CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Repararea este realizată de sisteme enzimatice care pot preceda procesul de replicare sau, dimpotrivă, acţionează postreplicativ.

Enzimele reparatorii ce preced replicarea sunt în general enzime constitutive şi pot fi surprinse de replicare în următoarele situaţii:

- leziunea este complet remediată şi bifurcaţia de replicare trece normal;
- leziunea permite trecerea aparatului replicator dar catena în formare rămâne incompletă;
- leziunea nereparată, încă, nu permite desfăşurarea replicării.

De menţionat că sistemul inductibil de reparare este tranzitoriu, încetându-şi activitatea când acţiunea inductorilor săi a luat sfârşit.

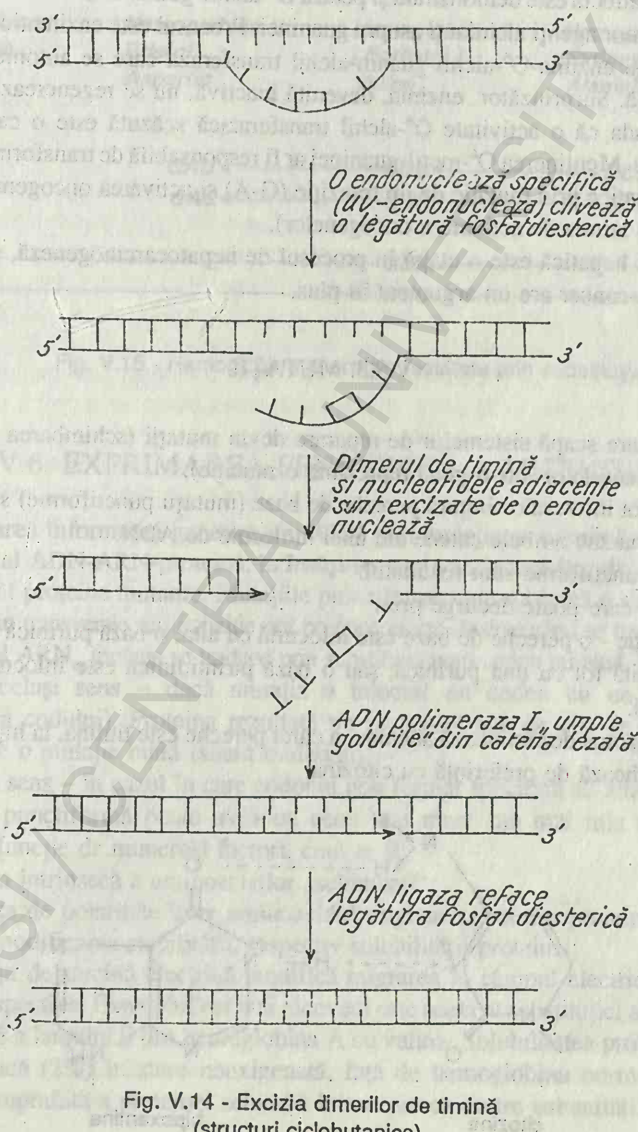


Fig. V.14 - Excizia dimerilor de timină (structuri ciclobutanice).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V.5.2. REPARAREA PRIN REVERSAREA LEZIUNILOR

Pe lângă mecanismele de reparare prin excizie-resinteză există şi posibilitatea de reversare a leziunilor ADN. Astfel, dimerii de timină pot să reformeze „monomeri" sub acţiunea luminii.

Reversarea acestui tip de leziune se datorează activării, sub acţiunea luminii (300-600 nm), a unei fotoliaze (enzima fotomerizantă) care recunoaşte regiunea ADN distorsionată de dimer, pe care îl clivează.

Reversarea directă este demonstrată şi pentru O^6-alchil-guanine forma enolică, rezultate prin acţiunea unor agenţi alchilanţi asupra guaninei. Procesul este enzimatic şi acceptorul final este însăşi enzima-O^6-alchil-guanin-alchil transferaza care se autometilează la un reziduu cisteină. Surprinzător, enzima, devenită inactivă, nu se regenerează.

Există dovada că o activitate O^6-alchil transferazică scăzută este o caracteristică a ficatului cirotic. Menţinerea O^6-metil-guaninei ar fi responsabilă de transformarea malignă a celulelor hepatice prin mutaţie de tip tranziţie (G-A) şi activarea oncogenei celulare H-ras (mecanism admis de activare a oncogenelor).

Cum ciroza hepatică este o etapă în procesul de hepatocarcinogeneză, teoria privind relaţia mutaţie-cancer are un argument în plus.

V.5.3. MUTAŢII

Leziunile care scapă sistemelor de reparare devin mutaţii (schimbarea permanentă a secvenţei nucleotidelor într-o genă reprezintă o mutaţie).

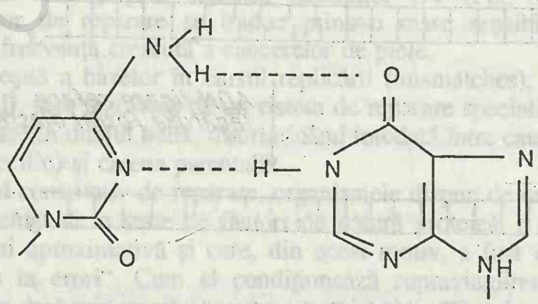
Mutaţiile pot interesa o singură pereche de baze (mutaţii punctiforme) sau un grup de baze, de pe una sau ambele catene ale unei molecule de ADN.

Mutaţiile punctiforme sunt rezultatul:

1. substituţiei care poate decurge prin:

   a) tranziţie - o pereche de baze este înlocuită cu alta; o bază purinică dintr-o catenă este înlocuită tot cu una purinică, sau o bază pirimidinică este înlocuită tot cu una primidinică.

   Acidul azotos dezaminează adenina, a cărei pereche este timina, la hipoxantină care se împerechează de preferinţă cu citozina:



b) transversie – o pereche de baze este înlocuită cu alta; o bază primidinică dintr-o catenă este înlocuită cu una purinică, sau una purinică cu una pirimidinică. În Fig. V.15 sunt reprezentate diferite mutaţii ce pot avea loc prin tranziţie şi transversie în gena structurală corespunzând lanţului β al hemoglobinei, având ca rezultat substituirea aminoacidului valină din poziţia 67 cu alţi aminoacizi şi deci apariţia unor hemoglobine anormale.

2. inserţiei.
3. deleţiei.

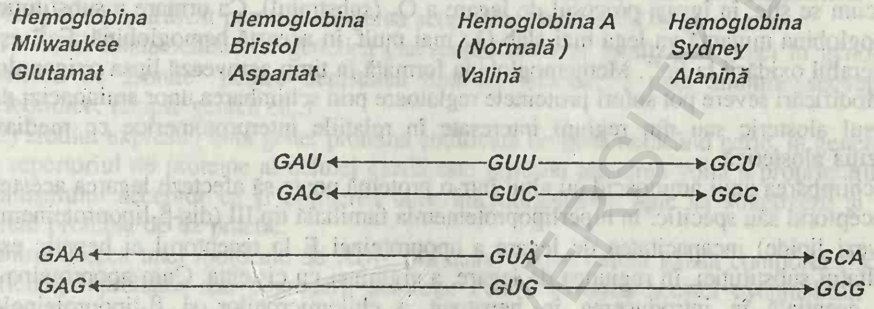


Fig. V.15 - Hemoglobine anormale rezultate prin substituţie

V.6. EXPRIMAREA FENOTIPICĂ A MUTAŢIILOR

Modificarea informaţiei genetice din ADN prin mutaţie se exprimă, datorită fluxului informaţional ADN-ARN-proteină, în însăşi secvenţa aminoacizilor din proteine. Aceste proteine sunt proteine mutante. Mutaţiile punctiforme care schimbă o singură bază dintr-un triplet prin transversie sau tranziţie pot produce efecte diverse când se traduc în proteine.

La nivelul ARN_m mutaţia se traduce prin substituţia unui codon cu altul. Aceştia pot fi:

a. Cu acelaşi sens – dacă mutaţia a înlocuit un codon cu un codon sinonim (degenerarea codului). Proteina rezultată nu se deosebeşte de cea de origine, mutaţia produsă este o mutaţie mută (silent mutation).

b. Cu alt sens – în cazul în care codonul nou format specifică alt aminoacid. O astfel de mutaţie punctiformă poate avea un ecou mai mare sau mai mic asupra expresiei fenotipice, funcţie de numeroşi factori, cum ar fi:

- calitatea intrinsecă a aminoacizilor „schimbaţi"
- diferenţa de polaritate între aminoacidul originar şi cel din proteina mutantă, ceea ce duce la modificarea stabilităţii, respectiv solubilităţii proteinei;
- diferenţa de sarcină electrică modifică migrarea în câmpul electric şi solubilitatea proteinei respective. Exemplul cel mai elocvent este acela al substituţiei acidului glutamic din poziţia 6 a lanţului β din hemoglobina A cu valina. Solubilitatea proteinei „mutante" este mai mică (2%) în stare neoxigenată, faţă de hemoglobina normală. Schimbarea sarcinii de suprafată a proteinei schimbă interacţiunea dintre subunităţi şi face ca ea să

precipite, formând cristale în formă de seceră (sickle), ceea ce conferă acestei proteine anormale denumirea de hemoglobină S. Hemoliza avansată care se produce determină ischemie tisulară mai mult sau mai puţin severă.

Proteina suferă modificări mai mici sau mai mari în funcţie de situarea aminoacidului substituit într-un loc mai mult sau mai puţin vital pentru structura, respectiv funcţia proteinei. De exemplu, dacă aminoacidul schimbat este integrat unei porţiuni de lanţ proteic angajat în legarea substratului, este probabil ca repercusiunile să fie severe, mergând până la abolirea capacităţii catalitice a proteinei. Un exemplu este cel al hemoglobinei M, în care histidina din poziţia 58 a lanţului alfa sau din poziţia 63 a lanţului beta este înlocuită cu tirozina. Histidina din poziţiile respective este implicată, aşa cum se ştie, în însuşi procesul de legare a O_2 (substratul). Ca urmare a substituţiei, hemoglobina mutantă va lega mai slab O_2; mai mult, în această hemoglobină, Fe^{2+} este vulnerabil oxidării la Fe^{3+}. Methemoglobina formată în timp agravează lipsa oxigenului.

Modificări severe pot suferi proteinele reglatoare prin schimbarea unor aminoacizi din locusul alosteric sau din regiuni interesate în relaţiile interprotomerice ce mediază tranziţia alosterică.

Schimbarea unui aminoacid cu altul într-o proteină poate să afecteze legarea acesteia la receptorul său specific. În hiperlipoproteinemia familială tip III (dis-β-lipoproteinemie — vezi lipide) incapacitatea de legare a apoproteinei E la receptorul ei hepatic este rezultatul substituţiei, în regiunea de legare, a argininei cu cisteina. Cum apoproteina E este esenţială în introducerea în hepatocit a chilomicronilor şi β-lipoproteinelor remanente, se constată acumularea acestora în sânge, cu apariţia aterosclerozei.

Se poate întâmpla ca un codon sens, ce codifică un aminoacid, să fie înlocuit cu un codon non sens, terminator. În acest caz, întrucât transcrierea se termină prematur, se obţin lanţuri proteice incomplete, nefuncţionale, care sunt degradate.

Inserţiile şi deleţiile conduc la mutaţii „în coloană" (frame shift mutation) atunci când numărul de perechi de baze adăugate sau scoase dintr-o secvenţă nucleotidică nu este multiplu de 3. Citirea ARN_m corespunzător unei gene în care s-au produs astfel de mutaţii generează proteine nefuncţionale.

Dacă inserţia sau deleţia se referă la un multiplu de trei perechi de baze, proteinei rezultate îi vor lipsi sau prisosi mai mulţi aminoacizi, ceea ce poate fi grav, mai puţin grav sau foarte grav.

V.7. CLONAREA GENELOR

V.7.1. CLONAREA GENELOR IN VIVO
(Tehnologia ADN recombinant)

Recombinarea genetică reprezintă un schimb de informaţie genetică între două genoame având ca rezultat crearea de molecule de ADN recombinat.

Schimburile genetice sunt posibile, natural, numai în cadrul aceleaşi specii, posibilitatea de recombinare constituind însuşi criteriul de definire a unei specii.

Recombinarea genetică între specii a apărut întotdeauna ca tentantă şi s-a anticipat ca avantajoasă.

Experienţele de ingineric genetică (tehnologia ADN recombinant) vizează inserţia unor gene de provenienţă animală sau vegetală (ADN recombinant) într-un vector potrivit (o moleculă de ADN) şi introducerea într-un mediu celular care să îi permită replicarea autonomă şi chiar exprimarea fenotipică.

Tehnologia ADN recombinant face apel la tehnicile de clonare (a clona = a face copii identice dintr-o singură celulă sau moleculă parentală; se obţine o clonă celulară sau moleculară).

Clonarea ADN presupune obţinerea unui mare număr de copii ale unui anumit fragment de ADN (ideal o genă), prin introducerea acestuia în complementul genetic al unui organism şi replicare ulterioară.Obţinerea unor cantităţi mari din fragmentul de ADN izolat şi purificat permite atingerea scopurilor clonării ADN şi anume:

1) studii fundamentale de genetică (secvenţializarea şi localizarea genei în genom, obţinerea de „sonde" pentru depistarea dintr-un amestec a unei anumite secvenţe nucleotidice, terapie genică etc.)

2) studiul expresiei unei gene; proteina codificată de genă nefăcând parte, în general, din repertoriul de proteine al celulei gazdă este posibilă alterarea voită a proprietăţilor organismului acceptor ca şi obţinerea unor microorganisme apte să sintetizeze şi să secrete proteine de uz practic.

Introducerea unei molecule de ADN „ca atare" într-o celulă gazdă comportă riscul ineficienţei preluării sau degradării acesteia. Pentru evitarea acestei eventualităţi se apelează la un vector de clonare — o moleculă ADN, în general, extracromozomial, care îndeplineşte două proprietăţi fundamentale: este invulnerabil la acţiuni distructive şi posedă o origine a replicării.

V.7.1.1. „Scenariul" clonării genelor; obţinerea ADN recombinat

„Scenariul" pe care îl presupune clonarea parcurge etapele:

I. includerea fragmentului de ADN conţinând gena de clonat (ADN recombinant) într-un vector de clonare, cu formarea unei molecule hibride desemnată ca moleculă de ADN recombinat;

II. introducerea moleculei de ADN recombinat în celula gazdă, în care i se permite să se replice, urmată de selectarea celulelor transformate. Gazda cea mai utilizată este E. coli. Parcurgerea unui mare număr de cicluri celulare generează o populaţie de celule conţinând copii multiple ale moleculei de ADN recombinat (o clonă);

III. recuperarea ADN recombinat din extractele celulare şi obţinerea genei clonate.

I a) Clonarea unui anumit fragment de ADN presupune identificarea şi obţinerea sa în stare pură din genomul unei celule. Această operaţie este practicabilă numai pentru genoamele de mici dimensiuni.

ADN donor al genei de interes, ca şi ADN vector, sunt clivaţi astfel încât să se poată forma extremităţi monocatenare omoloage, având posibilitatea de a realiza o sinapsă moleculară. Decisivă în implinirea acestei necesităţi a fost descoperirea enzimelor de restricţie. Aceste endonucleaze recunosc în molecula de ADN o secvenţă anumită de baze şi clivează câte o legătură fosfat diesterică de pe ambele catene, într-un loc particular al secvenţei recunoscute. Situsurile de recunoaştere pentru cele mai multe enzime de restricţie sunt palindroame care prezintă dublă simetrie rotaţională. Un palidrom este definit ca o porţiune de ADN în care secvenţa nucleotidică, citită pe ambele catene în direcţia 5' 3'; este identică.

Dintre diversele tipuri de enzime de restricţie, tipul II are legătură directă cu tehnica ADN recombinant. A fost caracterizat un număr foarte mare de enzime de restricţie tip II, având specificităţi diferite şi provenind dintr-o varietate de bacterii. O selecţie a celor mai uzuale este dată în tabelul V.3. Unele enzime de restricţie „taie" moleculele de ADN bicatenar decalat, producând segmente purtătoare de extremităţi monocatenare coezive (conţinând nucleotide complementare) ce permit sinapsa fragmentelor altfel neomoloage. Astfel, restrictaza Eco R-I, izolată din Escherichia coli, recunoaşte secvenţa palidromică 5' GAATTC 3' şi taie între G şi A. Secvenţa de pe cealaltă catenă 3' CTTAAG 5' va fi tăiată tot între G şi A. Evident, rezultă fragmente de ADN cu capete monocatenare complementare:

Tabelul V.3.

Situsurile de recunoaştere şi clivare ale unor enzime de restricţie

Enzima de restricţie	*Secvenţa recunoscută (*, indică situsul de metilare)*	*Provenienţa*
Eco R I	5' G↓AA*TTC3'	Escherichia coli Ry13
Eco R II	↓CC*(A/T)GG	Escherichia coli Ry245
Hae III	GG↓C*C	Haemophilus aegyptius
Hind III	A↓AGCTT	Haemophilus influenzae Rd
Hpa II	C↓C*GG	Haemophilus parainfluenzae
Pst I	CTGCA↓G	Providencia stuartii 164
Taq I	T↓CGA*	Thermus aquaticus
Bam H I	G↓GATCC	Bacillus amyloliquefaciens H

```
          ↓
5'—G—A—A—T—T—C—3'
5'—C—T—T—A—A—G—5'
                ↑
      Eco RI
—G                  A—A—T—T—C—
—C—T—T—A—A               G—
```

Alte endonucleaze de restricţie taie ADN bicatenar, formând capete boante (blunt ends), drepte, necoezive. Hpa I, obţinută din bacteria Haemophilus parainfluenzae, taie astfel:

```
5'—G—T—T—A—A—C—3'
3'—C—A—A—T—T—G—5'
          ↓ Hpa I
5'—G—T—T            A—A—C—3'
3'—C—A—A            T—T—G—5'
```


BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

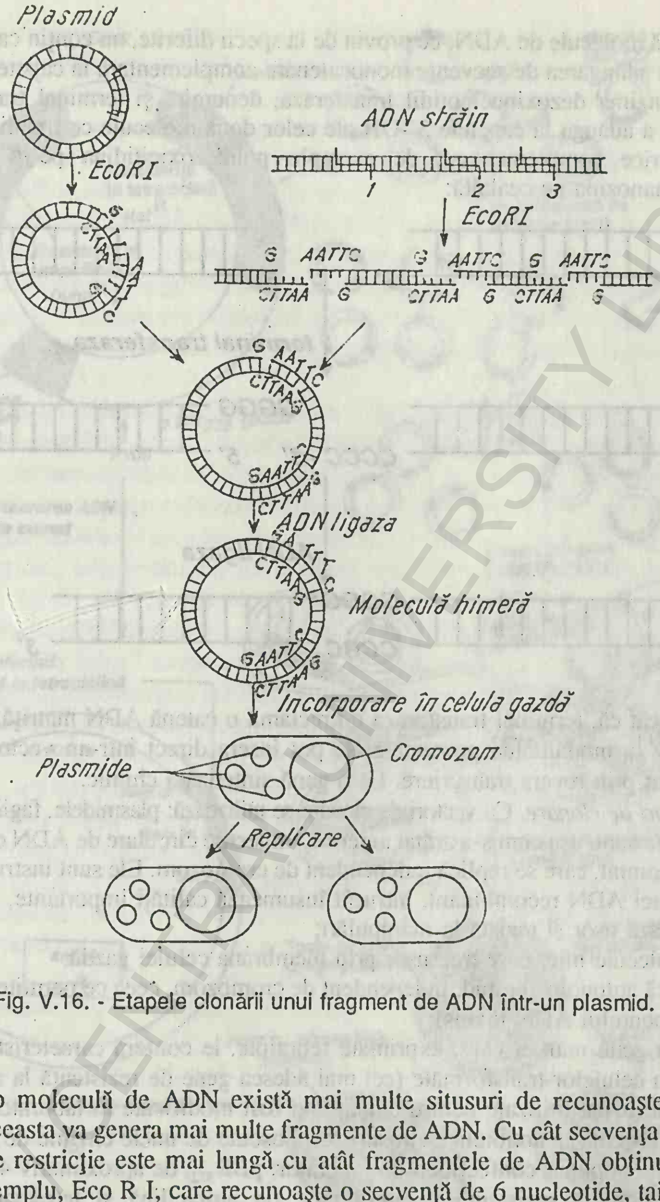


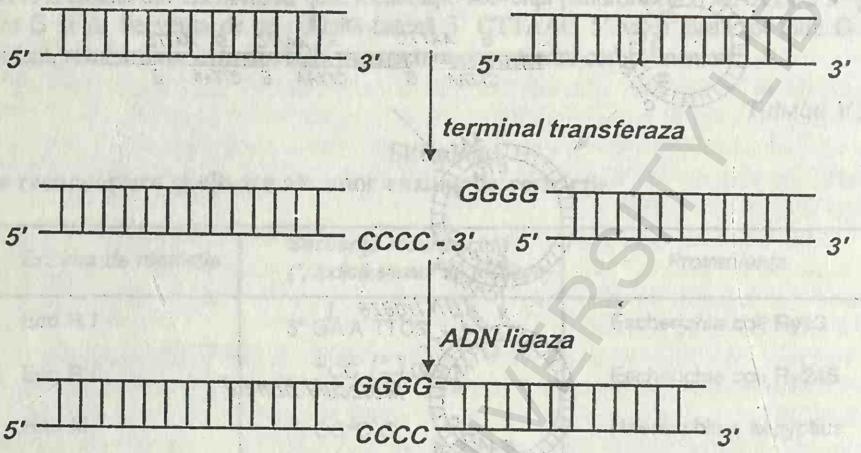
Fig. V.16. - Etapele clonării unui fragment de ADN într-un plasmid.

Dacă pe o moleculă de ADN există mai multe situsuri de recunoaştere pentru o restrictază, aceasta va genera mai multe fragmente de ADN. Cu cât secvenţa recunoscută de enzima de restricţie este mai lungă cu atât fragmentele de ADN obţinute sunt mai lungi. De exemplu, Eco R I, care recunoaşte o secvenţă de 6 nucleotide, taie fragmente de 10-20000 nucleotide, care pot să corespundă la una sau mai multe gene.

Fragmentele obţinute prin acţiunea mai multor enzime de restricţie, adesea unigenice, pot fi separate prin diferite metode.

Dacă atât ADN donor al unei gene, cât şi plasmidul vector sunt clivaţi de aceeaşi restrictază, de exemplu Eco R I, este posibilă inserţia genei în plasmid prin împerecherea nucleotidelor de la nivelul capetelor coezive (Fig. V.16). O ligază stabileşte legături fosfat diesterice sudând plasmidul devenit recombinat.

Dacă două molecule de ADN, ce provin de la specii diferite, nu conţin capete coezive, se recurge la adăugarea de secvenţe monocatenare complementare la capetele celor două molecule. Enzima dezoxinucleotidil transferaza, denumită şi terminal transferaza, are abilitatea de a adăuga la capetele 3'-OH ale celor două molecule ce trebuie sudate cozi homopolimerice complementare, de exemplu polidezoxicitidina pe o moleculă şi polidezoxiguanozina pe cealaltă:



De remarcat că, terminal transferaza nu reclamă o catenă ADN matriţă.

Alternativ la modalitatea prezentată, se pot insera direct într-un vector adecvat fie ADN_c obţinut prin revers transcriere, fie o genă sintetizată chimic.

I. b) *Vectori de clonare*. Ca vectori de clonare se utilizează: plasmidele, fagii, cosmidele.

Plasmidele sunt, aşa cum s-a arătat anterior, molecule circulare de ADN dublu catenar, extracromozomial, care se replică independent de cromozom. Ele sunt instrumente ideale ale tehnologiei ADN recombinant, întrucât însumează calităţi importante, cum ar fi:

- se izolează uşor şi rezistă la manipulări;
- sunt molecule mici care trec uşor prin membrana celulei gazdă;
- se replică autonom şi rapid, independent de cromozom, ceea ce permite amplificarea genei (fragmentului ADN inclus);
- prezintă gene marker care, exprimate fenotipic, le conferă caracteristici ce permit selecţionarea celulelor transformate (cel mai adesea gene de rezistenţă la antibiotice).

Plasmidele uzual utilizate pentru clonare au fost modificate în laborator şi conţin în genele de rezistenţă la antibiotice situsuri recunoscute de unele enzime de restricţie. Un plasmid foarte popular, confecţionat în laborator, pBR_{322}, de aproximativ 4 kb, are două gene care-i conferă rezistenţă la antibiotice (la ampicilină şi tetraciclină), ambele incluzând situsuri recunoscute de anumite enzime de restricţie (Fig. V.17 a). Dacă atât fragmentul de clonat, cât şi plasmidul s-au tăiat cu aceeaşi enzimă de restricţie, de exemplu Pst I care taie secvenţa CTGCA$^{\downarrow}$G (prezentă în gena care-i conferă rezistenţa la ampicilină), capetele lor complementare se vor lega, constituind plasmidul recombinat - o moleculă himeră (Fig. V.17.b).

Introducerea plasmidelor recombinate în celule bacteriene-gazdă se face prin procesul numit „transformare", cu obţinerea unor celule „transformate" genetic.

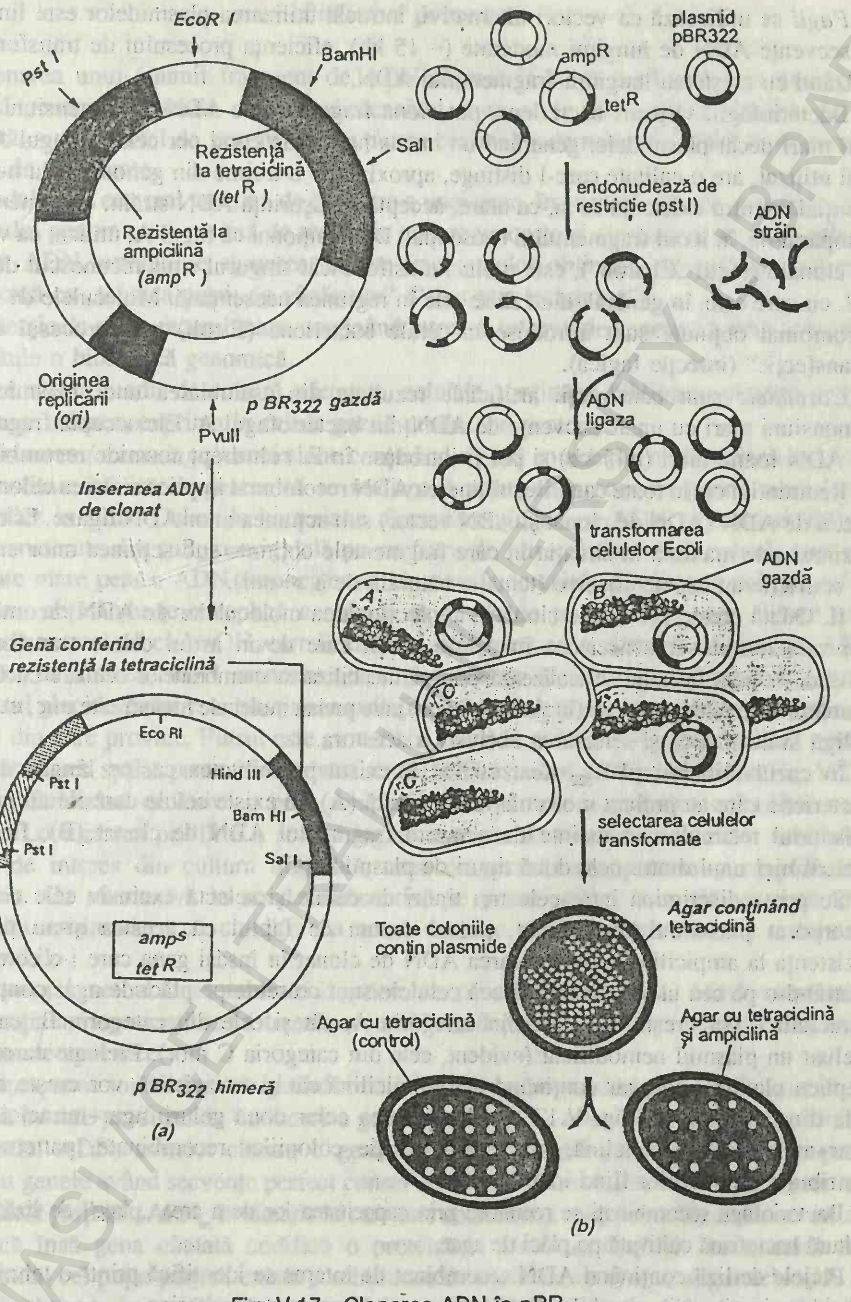


Fig. V.17 - Clonarea ADN în pBR_{322}

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fagii se utilizează ca vectori alternativi, întrucât utilizarea plasmidelor este limitată la secvenţe ADN de lungimi moderate (~ 15 kb), eficienţa procesului de transformare scăzând cu creşterea lungimii fragmentului ADN.

Bacteriofagii, virusuri bacteriene, pot clona fragmente de ADN de dimensiuni mult mai mari decât plasmidele, generând un imens număr de copii per celulă. Fagul A, cel mai utilizat, are o calitate care-l distinge, aproximativ o treime din genomul său nu este esenţială pentru existenţa sa şi, ca atare, acceptă cu uşurinţă ADN străin, de dimensiuni comparabile, în locul fragmentului neesenţial. De menţionat că fagul A, utilizat ca vector de clonare (fagul „Charon"), este prelucrat astfel încât singurul situs recunoscut de Eco R I, cu care este, în general, tăiat să se afle în regiunea neesenţială. Moleculele de ADN recombinat obţinute sunt introduse în celule bacteriene (E.coli) prin procesul numit „transfecţie" (infecţie fagică).

Cosmidele sunt construcţii artificiale rezultate din asamblarea unor plasmide de dimensiuni mari cu unele secvenţe de ADN din bacteriofagul A. Ele acceptă fragmente de ADN foarte mari (>45 kb) şi pot fi introduse în E. coli drept cosmide recombinate.

Reamintim că, în toate cazurile, obţinerea ADN recombinat implică sudarea celor două specii de ADN (ADN de clonat şi ADN vector) sub acţiunea unor ADN ligaze. Eficienţa enzimei este maximă în situaţia în care fragmentele obţinute sub acţiunea unor enzime de restricţie au capete coezive (tentaţie naturală de a se uni).

II. Odată create premizele clonării, confecţionarea moleculelor de ADN recombinat, urmează introducerea acestora în celule gazdă care devin astfel celule transformate genetic. Această operaţie se realizează prin permeabilizarea membranelor celulare cu Cl_2Ca. Numărul de celule bacteriene (în general E.coli) care preiau molecule himeră este mic, ceea ce obligă la detectarea şi selectarea exclusiv a acestora.

În cazul utilizării pBR_{322} tăiat cu Pst I, există posibilitatea ca, pe lângă celulele bacteriene care au preluat molecula recombinată (A), să existe celule care fie au preluat plasmidul recircularizat înainte de a insera fragmentul ADN de clonat (B), fie n-au preluat nici unul dintre cele două tipuri de plasmide (C).

Se poate discrimina între cele trei tipuri de celule şi selecta exclusiv cele care au încorporat plasmidul recombinat, ţinând seama de faptul că acestea şi-au pierdut rezistenţa la ampicilină, prin inserarea ADN de clonat în însăşi gena care i-o conferea, păstrând-o pe cea la tetraciclină. Dacă celulele sunt crescute pe plăci de agar conţinând tetraciclină, vor creşte atât cele din categoria A, cât şi cele din categoria B, care au preluat un plasmid nemodificat (evident, cele din categoria C mor). Preluate ca replică (replica plating), pe agar conţinând atât ampicilină cât şi tetraciclină vor creşte numai cele din categoria B (Fig. V.17 b). Compararea celor două geluri: agar+tetraciclină şi agar+ampicilină+tetraciclină, precizează poziţia coloniilor recombinate, patternul de distribuţie a coloniilor fiind identic.

Bacteriofagii recombinaţi se recunosc prin capacitatea lor de a crea „plaje" de liză într-o cultură bacteriană cultivată pe plăci de agar.

Plajele de liză conţinând ADN recombinat de interes se identifică printr-o tehnică de hibridare in situ ("in situ hibridization"), ce va fi prezentată ulterior.

III. ADN heterolog se „scoate" din plasmidul recombinat prin tăierea acestuia cu aceeaşi enzimă de restricţie care l-a generat.

Clonarea unui anumit fragment de ADN obţinut în stare pură este prin excelenţă dificilă pentru genoamele de mari dimensiuni, cum ar fi cel uman. Hidroliza, fie şi limitată, a unui astfel de genom, sub acţiunea enzimelor de restricţie, duce la un număr imens de fragmente.

Modalitatea cea mai practică de separare a unei gene, în această situaţie, este hidroliza întregului genom cu o enzimă de restricţie care recunoaşte şi cliveazā o secvenţă relativ rară în ADN, urmată de clonarea tuturor fragmentelor obţinute. Această tehnică este cunoscută ca „tehnica puştii de vânătoare" ("shot gun technique").

Colecţia de clone recombinate, conţinând întreaga informaţie genetică a unui organism constituie o bibliotecă genomică.

Crescute în medii de cultură adecvate, celulele conţinând biblioteca clonată se pot replica şi, adesea, exprima în celula gazdă producând proteine.

Selectarea (screeningul) unei clone conţinând o genă anume din multitudinea de clone ce constituie biblioteca genomică se realizează printr-un proces ce poartă numele de „hibridare in situ". Coloniile bacteriene, fiecare conţinând un ADN recombinat diferit, sunt transferate din cultura originală pe un filtru de nitroceluloză (sau nylon), care are afinitate mare pentru ADN monocatenar. Un număr de celule din fiecare colonie aderă la filtru, obţinându-se o replică a culturii originale de pe gelul de agar. Filtrul (sau nylonul) se tratează cu NaOH, care lizează celulele bacteriene, denaturând totodată ADN conţinut în acestea. ADN monocatenar se leagă ferm la filtrul de nitroceluloză (prin scheletul glucidofosforic, sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete sau a temperaturii) în poziţia clonei din care provine. Filtrul este „tratat" cu o sondă radioactivă monocatenară pentru gena de interes, spălat, pentru îndepărtarea sondei în exces, uscat şi autoradiografiat (Fig. V.18). Sonda, hibridizând exclusiv cu gena complementară, permite vizualizarea coloniilor ce o conţin. Localizarea pe filtru a sondei legate corespunde localizării celulelor conţinând clona de interes din cultura originală, ceea ce permite recuperarea şi amplificarea acesteia. Ca alternativă la sonda radioactivă se poate utiliza o sondă asociată unei activităţi enzimatice, cu condiţia ca actul catalitic să se soldeze cu un eveniment perceptibil.

Avantajul net al unei biblioteci genomice constă în faptul că, odată constituită, informaţia înmagazinată se păstrează, accesul la ea depinzând exclusiv de disponibilitatea unei sonde specifice.

Natura unei sonde depinde de informaţia pe care o avem despre gena de interes. În situaţia în care produsul de traducere a genei de interes nu este caracterizat, se pot folosi ca sonde: ADN_c anterior clonat, o genă omoloagă clonată provenită din altă specie (pentru genele având secvenţe perfect conservate în cursul evoluţiei hibridizarea este mai mult decât parţială), ARN_m în situaţia în care este abundent şi uşor de purificat dintr-o celulă.

Dacă însă gena căutată codifică o proteină a cărei secvenţă de aminoacizi este cunoscută, cel puţin parţial, există posibilitatea de a utiliza, ca sonde, oligonucleotide de sinteză obţinute în conformitate cu codul genetic. Ţinând seama de o caracteristică a acestuia — codul genetic este degenerat — devine evident faptul că ideale sunt proteinele foarte bogate în aminoacizi specificaţi de unul (metionină, triptofan) sau cât mai puţini codoni, pentru a reduce ambiguitatea. Din setul de oligonucleotide sintetizate, folosite ca sondă mixtă,

BOOKS ... UNIVERSITY LIBRARY

unul va hibrida perfect cu gena de interes. Posibilitatea ca un oligonucleotid să hibrideze, prin hazard, cu secvenţe din alte gene obligă la verificarea cu un nou set de oligonucleotide sintetizat conform unei alte secvenţe aminoacidice din proteina de interes (Fig. V.19).

Biblioteci genomice provenind de la specii animale diferite, clonate de preferinţă în bacteriofagi, stau la dispoziţia laboratoarelor de genetică.

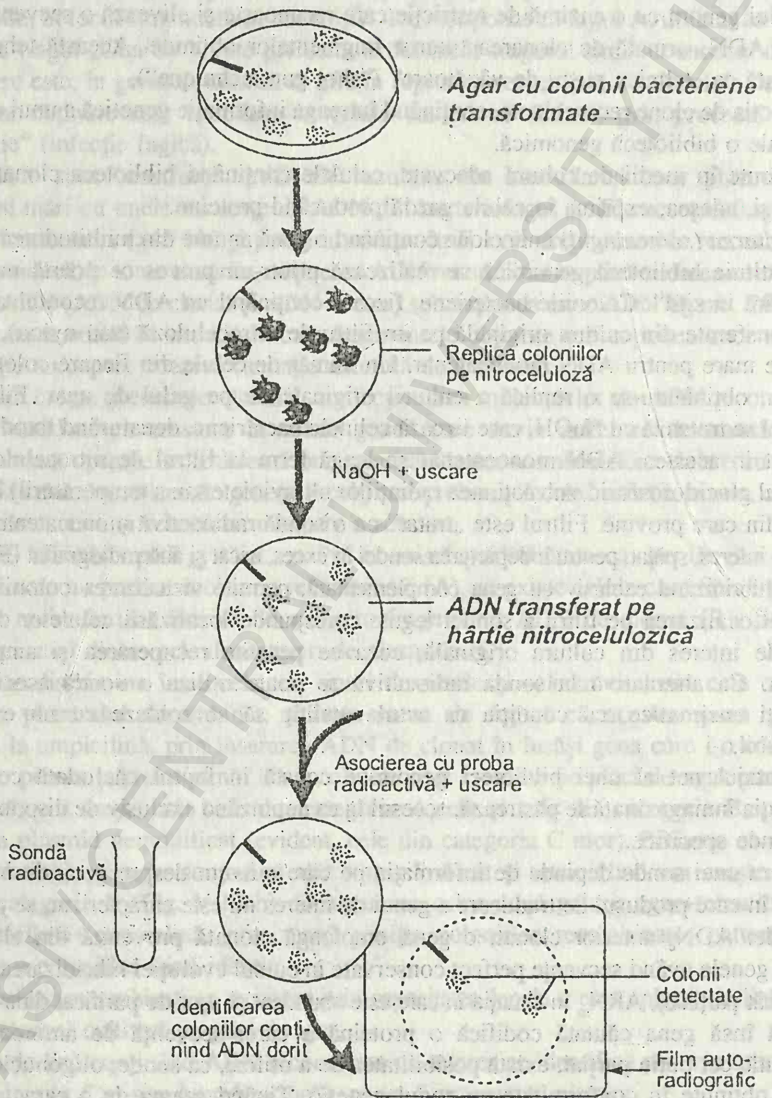


Fig. V.18 - Identificarea unei clone conţinând segmentul de ADN dorit.

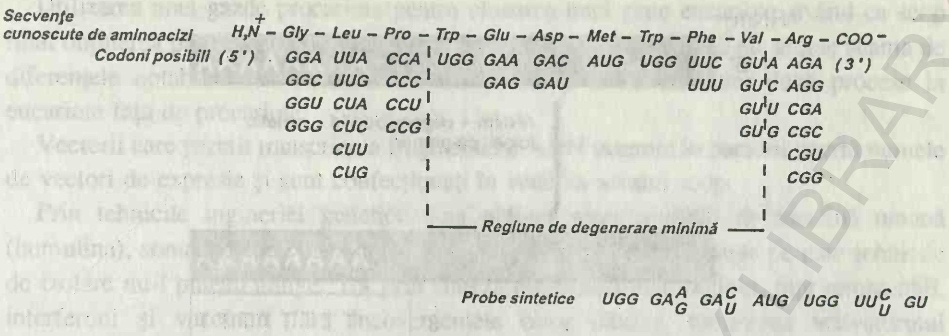


Fig. V.19 - Detectarea genei unei proteine cu secvență de aminoacizi cunoscută.

Biblioteci ADN_c

Pentru genoamele de mari dimensiuni, utilizarea unei biblioteci genomice comportă probleme, identificarea unei gene anume fiind o operațiune dificilă. Este motivul pentru care, cel puțin în situația în care scopul clonării este acela de a obține o anume proteină eucariotă, se recurge la o bibliotecă ADN_c. Pentru constituirea ei, ARN_m matur se separă de celelalte tipuri de ARN celular, mult mai abundente, prin cromatografie de afinitate pe oligodT imobilizat pe coloană. Hibridează cu oligodT exclusiv ARN_m care sunt purtătorii unei cozi poliA; modificarea temperaturii și concentrației saline permite eluarea ARN_m. Toate moleculele de ARN_m dintr-o celulă vor servi ca template pentru sinteza unor ADN_c monocatenari, sub acțiunea unor revers transcriptaze virale (Fig. V.20). ADN_c dublu catenari, formați pe monocatenele ADN sub acțiunea unei ADN polimeraze modificate, se inseră în vectori de clonare care-i vor introduce în celulele gazdă, constituindu-se o bibliotecă ADN_c.

De remarcat că, pentru un organism dat bibliotecile genomice au același conținut, indiferent de țesutul utilizat ca sursă de ADN, în timp ce conținutul unei biblioteci ADN_c exprimă funcțiile specializate ale fiecărui tip de celulă, reflectate în expresia diferită a unor gene particulare în diferite țesuturi.

Reprezentând toate genele exprimate la un moment dat într-un țesut dat, numărul de clone cuprinse într-o bibliotecă ADN_c completă este relativ mic în comparație cu numărul de clone dintr-o bibliotecă genomică și deci depistarea unei clone particulare va fi ușurată. O bibliotecă ADN_c, reprezentând molecule de ARN_m foarte abundente sau mai puțin abundente, este deci mai „tentantă" decât o bibliotecă genomică. Ea prezintă și avantajul posibilității unei gene eucariote de a se exprima în gazde procariote întrucât lipsa intronilor nu pune gazdei problema existenței unui aparat de excizie. ADN_c pot, la rândul lor, să servească ca sonde pentru a „pescui" într-o bancă genomică anumite gene.

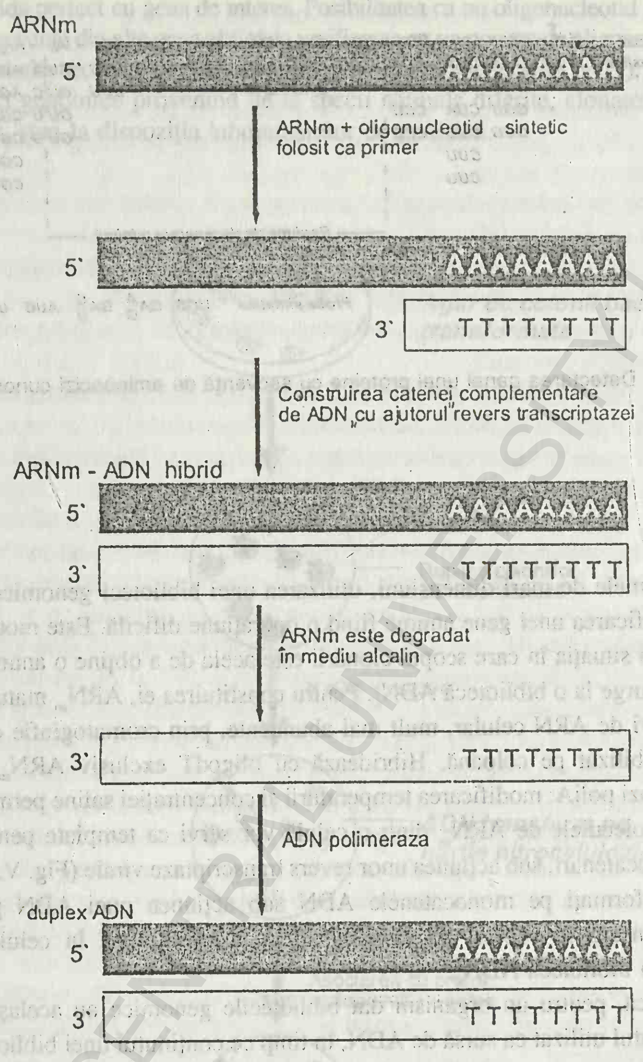


Fig. V.20 - Construirea unei biblioteci ADN_c foloseşte ARN_m sintetizat prin revers transcriere.

V.7.1.2. Exprimarea fenotipică a informaţiei cuprinsă în ADN recombinat

Plasmidele hibride, ca şi bacteriofagii hibrizi, reprezintă nu numai o sursă abundentă de ADN heterolog, dar şi o modalitate de a obţine în celula gazdă mari cantităţi de proteine specificate de genele inserate. Clonarea operonului triptofan din E. coli, de exemplu, a permis sinteza celor cinci enzime ce-i corespund, reprezentând 40% din proteinele celulare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Utilizarea unei gazde procariote pentru clonarea unei gene eucariote, având ca scop final obţinerea proteinei corespunzătoare, poate fi însă un eşec dacă nu se ţine seama de diferenţele notabile între transcrierea, traducerea şi controlul celor două procese la eucariote faţă de procariote.

Vectorii care permit transcrierea fragmentelor ADN inserate în bacterii poartă numele de vectori de expresie şi sunt confecţionaţi în vederea acestui scop.

Prin tehnicile ingineriei genetice s-au obţinut mari cantităţi de insulină umană (humulina), somatostatină, hormoni de creştere, la un grad de puritate pe care tehnicile de izolare nu-l puteau atinge. Tot prin sinteză bacteriană s-au obţinut, fapt remarcabil, interferoni şi vaccinuri fără incovenientele celor clasice. Obţinerea activatorului plasminogenului, utilizat în tratamentul infarctului de miocard, şi a antitripsinei (inhibitor al elastazei), utilizată în tratarea enfizemului pulmonar, se numără printre succesele tehnologiei ADN recombinant.

Tehnica clonării genelor a rezolvat probleme de terapie medicală stringente (tratamentul diabetului insulino-dependent, a nanismului hipofizar etc.), a permis modificarea genetică a unor plante superioare (transfer de gene având ca rezultat creşterea eficienţei fotosintezei şi a rezistenţei la diferite condiţii de mediu), a produs bacterii specializate în degradarea unor poluanţi etc. Amplificarea genelor, prin clonare în bacterii, a permis succese remarcabile în genetică (secvenţializarea genelor, determinarea structurii cromozomilor la eucariote, mecanisme de control în exprimarea genelor). Se anticipează utilizarea rezultatelor clonării genelor în corectarea unor defecte metabolice înnăscute, prin transformarea genetică a unor celule somatice.

Este de sperat că manipularea genetică a microorganismelor va fi practicată exclusiv în serviciul existenţei, în spiritul celei mai înalte şi inalterabile bioetici.

Incapacitatea bacteriei gazdă de a recunoaşte elementele de control al sintezei de ARN şi proteine, adăugată la inexistenţa aparatului de excizie-coasere a intronilor, ca şi a celui de prelucrare posttranscriere, proprii eucariotelor, poate fi depăşită prin utilizarea unor vectori de clonare apţi să folosească gazde eucariote (drojdii, celule animale în cultură sau in vivo). Printre vectorii de acest tip, cei mai utilizaţi sunt vectorii retrovirali modificaţi.

Simplificând, procesul de clonare a unor vectori retrovirali în celulele animale parcurge etapele:

1) sub acţiunea revers transcriptazei, ARN retroviral generează un ADN dublu catenar, conţinând informaţia ARN;

2) o genă străină, cea dorită, se inseră în ADN, obţinându-se o moleculă de ADN recombinat. Acesta este incapabil să se replice şi să se transcrie, întrucât introducerea genei pasagere presupune ablaţia anterioară a genelor responsabile de aceste procese (pentru a-i „face loc" genei străine);

3) ADN recombinat este introdus în celule în cultură, în prezenţa, obligatorie, a unui „virus helper" ce permite transcrierea sa; ARN viral recombinat rezultat se asamblează în particule virale;

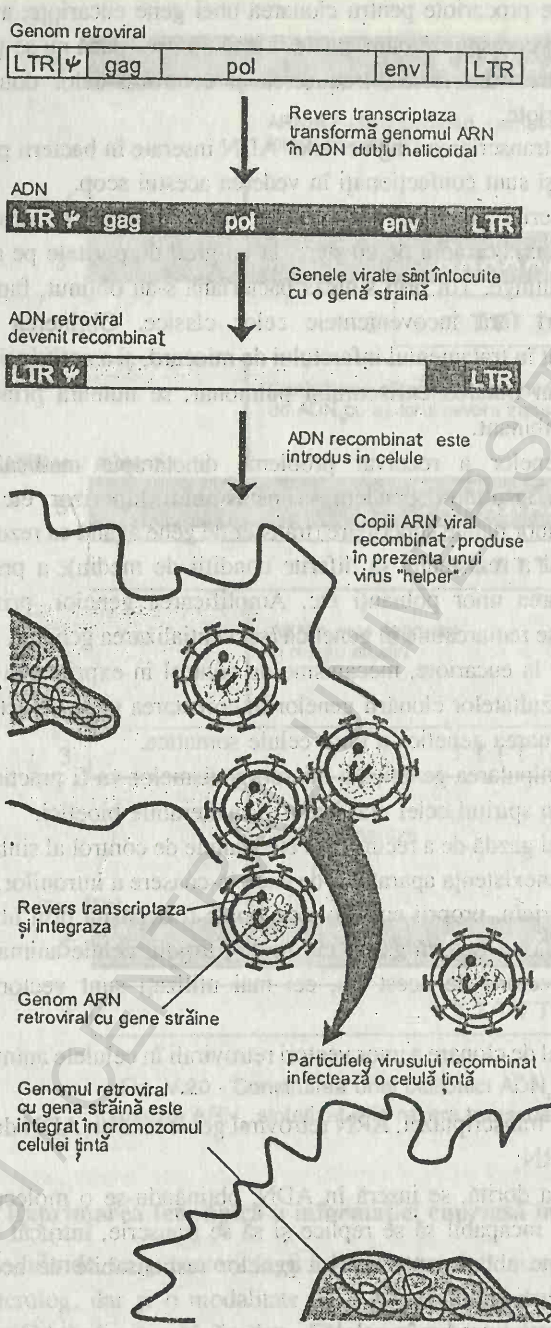


Fig. V.21 - Clonarea în celule animale a unor vectori retrovirali

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4) genomul retroviral, purtător al genei străine, este introdus în celule ţintă, unde este reconvertit la ADN recombinat care se integrează în genomul gazdă, unde se poate exprima (Fig. V.21).

Eficacitatea transferului genei trebuie să fie verificată atât la nivelul sintezei ARN_m cât şi la cel al sintezei proteinei normale.

Terapia genică

Terapia genică — un deziderat care prinde contur — urmăreşte înlocuirea unei gene defectuoase, exprimată într-un produs final defectuos, cu o genă normală (terapie de substituţie).

Un număr important de lucrări ştiinţifice recente se referă la utilizarea adenovirusurilor recombinate în tratamentul fibrozei chistice (mucoviscidoza). Tentativa a devenit posibilă prin separarea şi secvenţializarea genei responsabile de producerea acestei maladii, autosomal recesivă, afectând 1/2500 caucazieni, şi care se adresează, în principal, sistemului digestiv (în speţă pancreasului exocrin) şi respirator (secreţie bronşică excesivă cu consecinţa infecţiilor repetate).

Este stabilit că anomalia biologică fundamentală care stă la originea mucoviscidozei este disfuncţia unui canal ionic pentru cloruri, prezent în membrana celulelor epiteliale, disfuncţie datorată, în majoritatea cazurilor, deleţiei unor reziduuri de fenilalanină. Introducerea în epiteliul respirator a genei normale, folosind ca vector un adenovirus recombinat caracterizat printr-un tropism particular pentru epiteliul căilor respiratorii, a condus la rezultate încurajatoare.

Pe lângă vectorii virali, s-a încercat utilizarea lipozomilor, ca şi a unor compuşi fiziologici având afinitate crescută pentru membrana unor celule ţintă (imunoglobuline, transferina etc.)

Tehnici recente de terapie genică ocolesc incovenientele introduse de vectorii retrovirali, recurgând la microinjecţia de ADN (gena) în nucleul unei celule.

Microinjecţia de ADN într-un ovul de şoarece fecundat, care se introduce într-o femelă, permite exprimarea genei străine în şoriceii nou născuţi (animale transgenice). Prin această tehnică, s-a reuşit introducerea genei specificând hormonul de creştere uman în ADN cromozomial al şoarecelui, sub controlul unui promotor inductibil. Şoarecii proveniţi din embrionii injectaţi capătă dimensiuni fabuloase dacă în hrana acestora se include inductorul genei pentru hormonul de creştere.

Animalele transgenice permit evaluarea funcţiei celulare a genelor şi a produşilor specificaţi de ele în cursul diferenţierii, în diverse ţesuturi.

Se speră, în limitele unui optimism moderat, în tratarea bolilor genetice umane, în măsura în care defectul genetic este limitat la o singură genă, mecanismele biologice ce produc boala sunt înţelese şi gena normală este clonată. S-a experimentat terapia genică exclusiv pe boli genetice de mare gravitate, cum ar fi o formă de imunodeficienţă severă determinată de deficitul genei specificând adenozindezaminaza. Introducerea genei în celulele măduvei osoase pare să aibă rezultatul scontat.

Într-un viitor, nu tocmai apropiat, pare posibilă şi abordarea terapiei cancerului, scontându-se, inclusiv, pe clonarea genei ce specifică factorul de necroză tumorală (TNF).

De subliniat că, în timp ce terapia genică somatică (introducerea materialului genetic în celulele diploide ale organelor bolnave) este permisă, terapia genică germinală este interzisă prin lege sau prin consensul comunităţii ştiinţifice internaţionale.

V.7.2. CLONAREA GENELOR IN VITRO
(Reacţia polimerazică în lanţ)

O altă modalitate de amplificare a unui fragment specific de ADN, de data aceasta o amplificare in vitro, utilizează o reacţie enzimatică — aceea de polimerizare în lanţ a dezoxiribonucleotidelor (polymerase chain reaction = PCR).

Tehnica PCR, datorată lui Kary Mullis (1984), necesită:

1) molecule sau fragmente de ADN (provenind esenţial din lizate celulare);

2) oligonucleotide primeri (amorse), formate din 20-30 de dezoxiribonucleotide care hibridează perfect cu extremităţile 3' ale fragmentului de amplificat (în situaţia în care secvenţa acestuia se cunoaşte) sau cu secvenţe ce-l flanchează; acestea se pot obţine fie prin adăugarea unor fragmente sintetice la capetele fragmentului de analizat, fie prin inserţia fragmentului de amplificat, de secvenţă necunoscută, într-un vector de clonare de secvenţă cunoscută;

3) o ADN polimerază catalizând elongarea celor doi primeri. Utilizarea unei enzime termostabile Taq polimeraza – izolată din Thermus aquaticus – organism apt să trăiască activ la 75-85°C, simplifică metoda ce presupune variaţii de temperatură. Enzima s-a dovedit a avea o foarte bună procesivitate – calitate remarcabilă pentru o enzimă care edifică un polinucleotid;

4) cei patru dezoxiribonucleozid trifosfaţi.

Tehnica în sine reprezintă un ciclu repetabil, constând în:
- separarea celor două catene de ADN prin denaturare termică;
- cuplarea primerilor, adăugaţi în exces, cu secvenţele complementare (annealing);
- polimerizarea, respectiv elongarea primerilor în direcţia 5'-3'.

Operaţiile se repetă până la obţinerea unei cantităţi suficiente de produs. În general, ciclul se reia de 25-30 de ori, secvenţa de interes fiind dublată la fiecare ciclu, derulat pe parcursul câtorva minute (Fig. V.22). După câteva cicluri, produsul major este un fragment de ADN cu o lungime egală cu suma lungimilor celor doi primeri plus segmentul ADN de interes.

Atributele evidente ale acestei tehnici sunt: selectivitatea, sensibilitatea, rapiditatea. Fragmente de ADN virtual pure, din genoame complexe, pot fi obţinute pe parcursul câtorva ore, în contrast cu săptămânile „pretinse" de clonarea tradiţională.

Supremaţia metodei rezultă şi din cantitatea de material necesar — o singură moleculă de ADN şi nu milioane, necesare clonării „standard"; mai mult, tehnica nu presupune un ADN purificat. În plus, pentru amplificarea unui fragment specific de ADN nu este obligatoriu să se cunoască secvenţa nucleotidică a segmentului „ţintă" de ADN.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

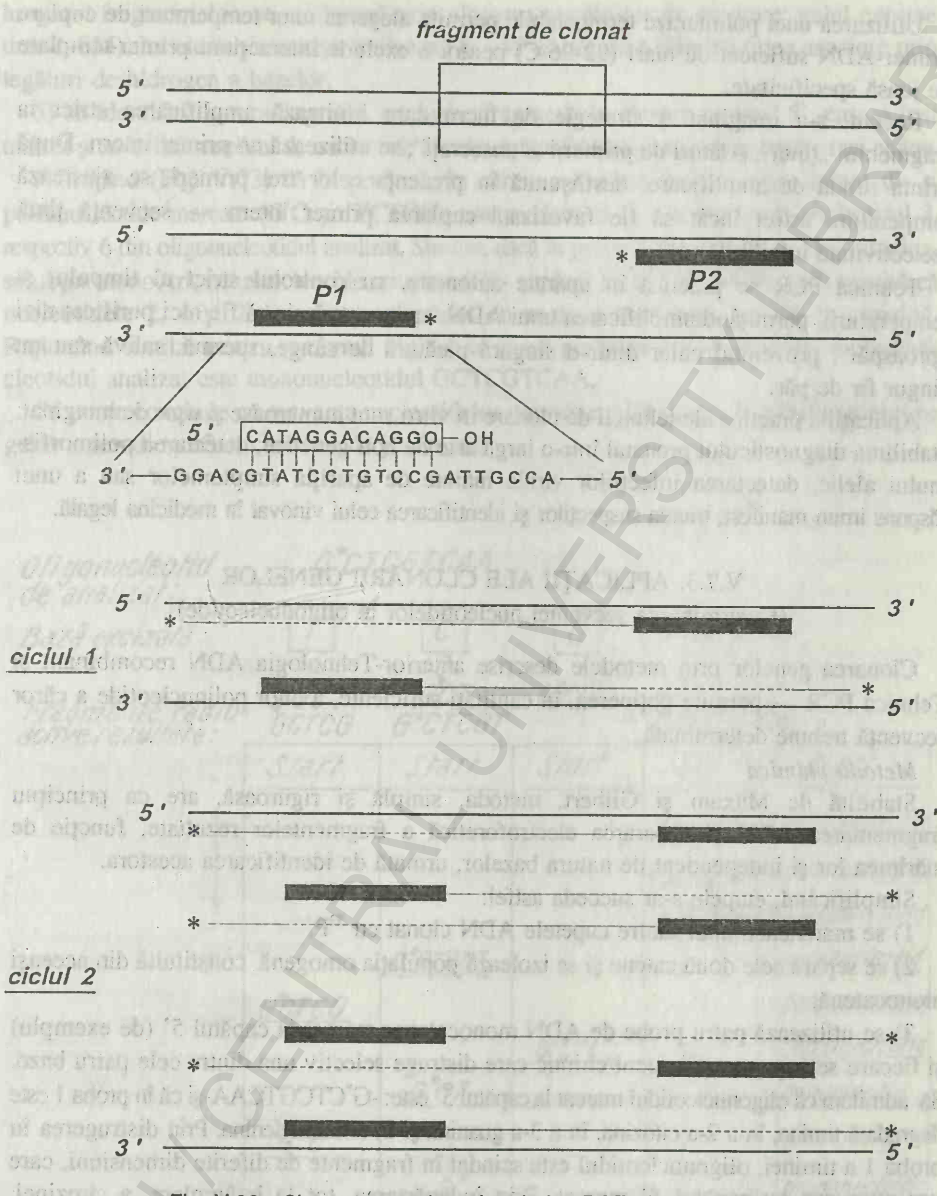


Fig. V.22 - Clonarea genelor prin tehnica PCR (P_1,P_2 = primeri)

Specificitatea se asigură, în speţă, prin alegerea unor primeri (care flanchează fragmentul de ADN „ţintă") suficient de lungi, astfel încât secvenţa lor să fie, virtual, unică în genom. Întrucât interacţiunea prin legături de hidrogen a primerilor cu fragmentul ţintă este dependentă de temperatură şi concentraţia salină, amplificarea specifică este condiţionată de stabilirea riguroasă a condiţiilor de lucru.

Utilizarea unei polimeraze termostabile permite alegerea unor temperaturi de cuplare primer-ADN suficient de mari (92-96°C) pentru a exclude interacţiuni primer-template de joasă specificitate.

Recent, s-a imaginat o strategie de lucru care limitează amplificarea strict la fragmentul „ţintă". Alături de primerii „consacraţi", se utilizează un primer intern. După prima rundă de amplificare, desfăşurată în prezenţa celor trei primeri, se ajustează temperatura astfel încât să fie favorizată cuplarea primer intern — secvenţă ţintă (selectivitate infailibilă).

Tehnica PCR se practică în aparate automate, cu controlul strict al timpului şi temperaturii, permiţând amplificarea unui ADN, care nu trebuie să fie nici purificat nici „proaspăt", provenind chiar dintr-o singură picătură de sânge, spermă, salivă sau un singur fir de păr.

Aplicaţiile practice ale tehnicii de clonare in vitro sunt numeroase şi uşor de imaginat: stabilirea diagnosticului prenatal într-o largă arie de boli genetice, detectarea polimorfismului alelic, detectarea infecţiilor virale înainte de apariţia simptomelor sau a unui răspuns imun manifest, trierea suspecţilor şi identificarea celui vinovat în medicina legală.

V.7.3. APLICAŢII ALE CLONĂRII GENELOR (Determinarea secvenţei nucleotidelor în oligonucleotide)

Clonarea genelor prin metodele descrise anterior-Tehnologia ADN recombinant şi Tehnica PCR — permite obţinerea, în cantităţi suficiente, a unor polinucleotide a căror secvenţă trebuie determinată.

Metoda chimică

Stabilită de Maxam şi Gilbert, metoda, simplă şi riguroasă, are ca principiu fragmentarea ADN şi separarea electroforetică a fragmentelor rezultate, funcţie de mărimea lor şi independent de natura bazelor, urmată de identificarea acestora.

Simplificând, etapele s-ar succeda astfel:

1) se marchează unul dintre capetele ADN clonat cu ^{32}P.

2) se separă cele două catene şi se izolează populaţia omogenă, constituită din aceeaşi monocatenă;

3) se utilizează patru probe de ADN monocatenar marcat la capătul 5' (de exemplu) şi fiecare se supune unui agent chimic care distruge selectiv una dintre cele patru baze. Să admitem că oligonucleotidul marcat la capătul 5' este: -G*CTCGTCAA-şi că în proba 1 este degradată timina, în a 2-a citozina, în a 3-a guanina şi în ultima adenina. Prin distrugerea în proba 1 a timinei, oligonucleotidul este scindat în fragmente de diferite dimensiuni, care vor avea sau nu capătul 5' marcat. Prin îndepărtarea, tot la întâmplare, a citozinei, guaninei, adeninei din probele 2,3,4, se obţin seturi de fragmente de dimensiuni diferite (mono, di, tri, tetra-nucleotide).

4) se separă electroforetic fragmentele obţinute în fiecare dintre cele patru probe, pe gel de poliacrilamidă.

Este necesar ca puterea de rezoluţie a gelurilor să permită separarea, neambiguă, a unor fragmente diferind printr-un singur nucleotid. Impunerea acestui unic criteriu, al

lungimii fragmentelor, se realizează prin alegerea condiţiilor de separare: gelul conţine uree (~8M), iar electroforeza se realizează la ~55°C, pentru a elimina orice asociere prin legături de hidrogen a bazelor.

5) se identifică autoradiografic, exclusiv, fragmentele dinspre capătul 5', care a fost marcat şi se indică numărul de nucleotide corespunzător fiecăruia prin comparare cu un etalon.

Admiţând (Fig. V.23) că în proba 1, în care s-a excizat timina, s-au obţinut di- şi pentanucleotide marcate (G*C şi G*CTCG), este evident că timina reprezintă nucleotidul 3, respectiv 6 din oligonucleotidul analizat. Similar, dacă în proba 2, din care s-a exclus citozina, se obţin mono, tri, hexanucleotide marcate (G*- capătul 5', G*CT, G*CTCGT) rezultă că nucleotidele 2, 4 şi 7 din oligonucleotidul de analizat sunt reprezentate de citozină. Raţionând similar pentru patternul obţinut în cazul probelor 2 şi 4, rezultă că oligonucleotidul analizat este mononucleotidul GCTCGTCAA.

Se poate conchide că secvenţa nucleotidelor din orice ADN poate fi stabilită direct pe gelul autoradiografiat, citindu-l de jos în sus.

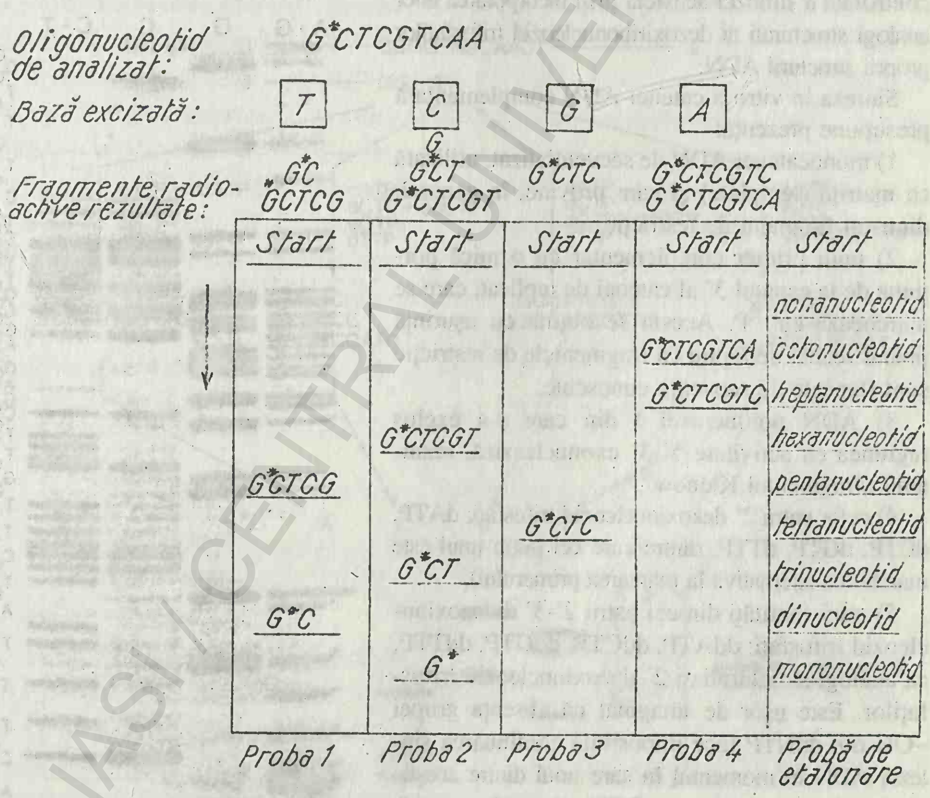


Fig. V.23 - Determinarea secvenţei nucleotidelor după tehnica Maxam şi Gilbert

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY

De menţionat că, în fapt, degradarea chimică afectează ambele baze purinice (atât A, cât şi G) ca şi ambele baze pirimidinice (atât C, cât şi T) în măsură diferită, funcţie de condiţii. Problema se rezolvă cu acurateţe, folosind probe cuplate; G şi G+A, C şi C+T. Modificând condiţiile de lucru, de exemplu în cadrul cuplului G/G+A, într-o probă se distruge, prin excelenţă, G, în timp ce în cea de-a doua se distrug şi se eliberează (prin ruperea legăturilor fosfat diesterice), la viteze comparabile, atât G, cât şi A. Reziduurile A se pot identifica comparând pe electroforeză poziţiile G cu cele G+A; similar pentru cuplul C/C+T (Fig. V.24).

Întrucât nucleotidul 5' terminal nu poate fi identificat (se distruge) şi o verificare a secvenţei catenei ADN în studiu este necesară, se recurge la secvenţializarea paralelă a catenei complementare, după marcarea acesteia cu ^{32}P.

Metoda enzimatică

O modalitate alternativă de determinare a secvenţei ADN clonat este metoda Sanger. Spre deosebire de metoda Maxam şi Gilbert, care este o metodă chimică, această tehnică este o metodă enzimatică; ea îşi propune să determine secvenţa catenei complementare cu cea de analizat, având ca principiu întreruperea controlată a sintezei acesteia prin încorporarea unor analogi structurali ai dezoxiribonucleozid trifosfaţilor proprii structurii ADN.

Sinteza in vitro a catenei ADN complementară presupune prezenţa:

1) monocatenei ADN de secvenţializat, utilizată ca matriţă (template) şi care provine, în general, dintr-un fragment de restricţie.

2) unui primer complementar cu o mică porţiune de la capătul 3' al catenei de replicat, care se marchează cu ^{32}P. Acesta se obţine cu uşurinţă ţinând seama de faptul că fragmentele de restricţie sunt flancate de secvenţe cunoscute.

3) ADN polimerazei I din care s-a exclus regiunea cu activitate 5'-3' exonucleazică, rezultând „fragmentul Klenow".

4) celor patru 2' dezoxinucleozid trifosfaţi: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dintre care cel puţin unul este marcat (ca alternativă la marcarea primerului).

5) mici cantităţi din cei patru 2'-3' didezoxinucleozid trifosfaţi: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, ca analogi structurali ai 2' dezoxinucleozid trifosfaţilor. Este uşor de imaginat că absenţa grupei –OH din ddNTP face imposibilă continuarea sintezei ADN în momentul în care unul dintre aceştia câştigă în competiţia cu dNTP dictat de matriţă. Sinteza ADN poate fi deci întreruptă, prematur şi întâmplător, la oricare dintre reziduurile nucleotidice.

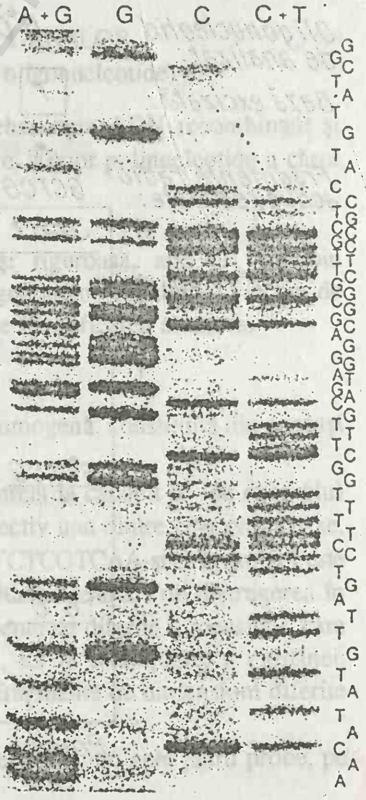


Fig. V.24 - Autoradiografie de control

Experimentul se realizează în patru probe distincte care diferă între ele, exclusiv, prin natura ddNTP utilizat. Fiecare probă va conţine fragmente de ADN de dimensiuni diferite având la capătul 3' acel ddNTP, apărut prin hazard, ori de câte ori ADN polimeraza I l-a încorporat în locul unui dNTP.

Cele patru seturi de fragmente obţinute în fiecare dintre cele patru probe se supun, după separarea fragmentelor nou sintetizate de catenele template, electroforezei în gel de poliacrilamidă sau agaroză şi se identifică prin autoradiografiere (Fig. V.25). Secvenţa se citeşte, ca şi în tehnica Maxam Gilbert, pe imaginea autoradiografică a gelului, de jos în sus, pe direcţia 5'-3'.

Pentru a evita iradierea şi a simplifica stocarea, marcarea cu ^{32}P, care permite vizualizarea fragmentelor ADN de diferite mărimi, a fost înlocuită fie cu legarea covalentă la primerul nucleotidic a unui compus fluorescent, diferit pentru fiecare dintre cele patru probe, fie cu ataşarea la un anumit ddNTP a unei molecule care prezintă fluorescenţă la o anumită lungime de undă. În cel de-al doilea caz, reunirea celor patru probe, după efectuarea replicării, urmată de electroforeza amestecului, duce la apariţia

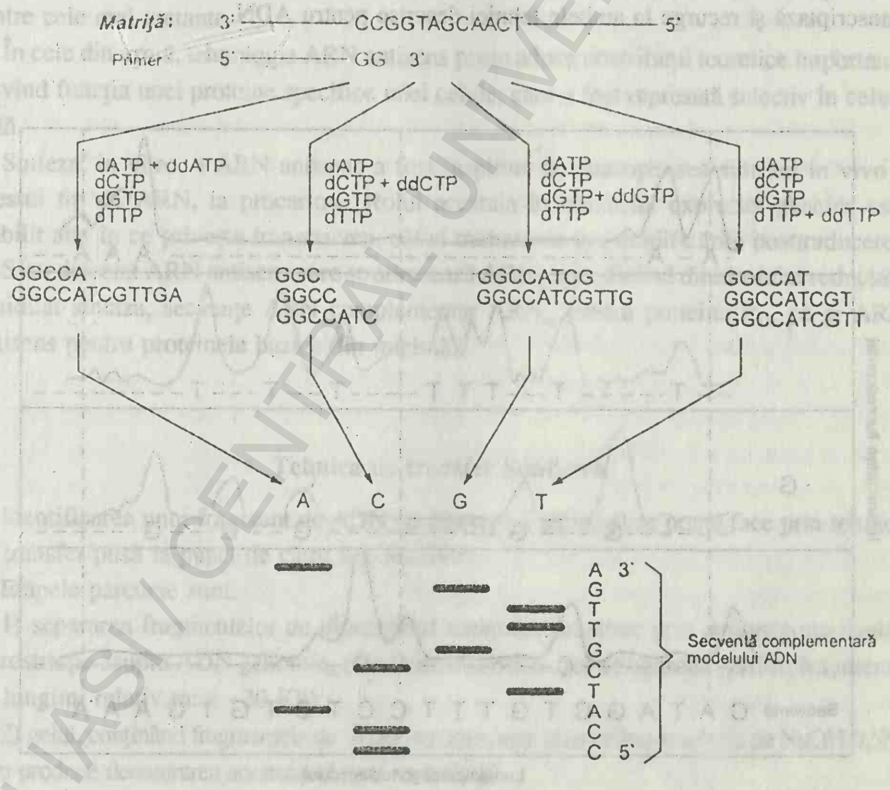


Fig. V.25 - Secvenţializarea ADN prin metoda Sanger
(secvenţa nucleotidelor se citeşte direct pe electroforegramă).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a numeroase benzi electroforetice, fiecare cu un spectru de fluorescenţă caracteristic capătului său 3' terminal, a căror succesiune indică succesiunea nucleotidelor în catena ADN (Fig. V.26).

Sistemul de detecţie a fluorescenţei este automatizat şi permite secvenţializarea unor fragmente de ADN (de peste 500 de perechi de baze), într-un ritm de ~10000 perechi de baze/zi. Secvenţa completă a peste 1000 gene, printre care cele codificând insulină, interferoni, citocromi, hemoglobină, interleukine, a fost stabilită.

Secvenţializarea completă a genomului E.coli este iminentă, iar cea a genomului uman pare să aparţină unui viitor apropiat, prin aportul decisiv al lui Fred Sanger, dublu laureat Nobel (pentru secvenţializarea proteinelor în 1958 şi pentru secvenţializarea acizilor nucleici în 1980).

Utilizarea tehnicilor de amplificare a ADN permite stabilirea bazei moleculare a bolilor genetice (peste 3000), obţinerea de sonde necesare diverselor tipuri de hibridizare, evaluarea produşilor unei gene (ARN_m, proteine).

Secvenţializarea ARN se face, cel mai adesea, după sinteza ADN_c, catalizată de revers transcriptază şi recurge la ambele tehnici descrise pentru ADN.

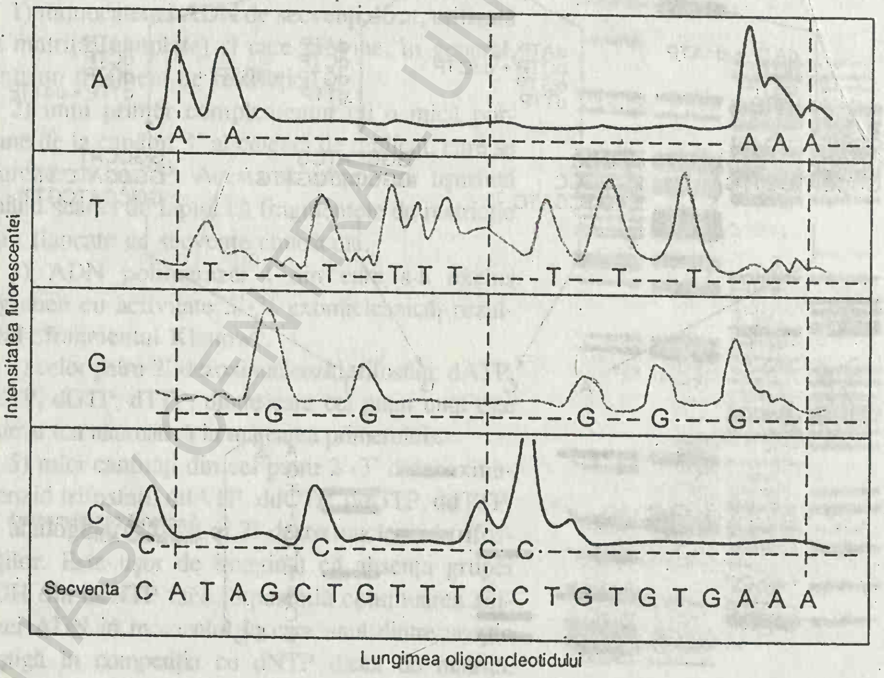


Fig. V.26. - Detecţia prin fluorescenţă a fragmentelor oligonucleotidice obţinute prin metoda didezoxi

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acizi nucleici antisens

Tehnicile de clonare permit, în cazul folosirii unor vectori de expresie, sinteza unor ARN antisens, respectiv a ARN având succesiunea nucleotidică (T=U) a catenei necodificatoare. Acest ARN este, desigur, complementar cu ARN_m, a cărei succesiune nucleotidică corespunde catenei codificatoare.

Un ARN antisens poate fi rezultatul clonării unei gene care este introdusă în vectorul de expresie în aval faţă de promotor, într-o orientare inversă, care-i schimbă polaritatea.

Transfecţia vectorului de expresie recombinat în celula parentală permite sinteza unui ARN antisens, celula dispunând astfel de ambele categorii de ARN (antisens şi mesager).

Hibridând perfect cu ARN_m, un ARN antisens va bloca traducerea celui dintâi, întrucât formarea hibridului nu numai că maschează situsul de legare la ribozomi, făcând mesajul inoperant, dar creşte şi susceptibilitatea la hidroliză a ARN_m.

Utilitatea producerii acizilor nucleici antisens este, în primul rând, terapeutică; posibilitatea de blocare a sintezei unei proteine virale cu eventual potenţial oncogen este dintre cele mai tentante.

În cele din urmă, tehnologia ARN antisens poate aduce contribuţii teoretice importante privind funcţia unei proteine specifice unei celule, care a fost represată selectiv în celula dată.

Sinteza, in vitro, a ARN antisens a fost inspirată de descoperirea sintezei in vivo a acestui tip de ARN, la procariote. Rolul acestuia în controlul expresiei genelor este stabilit atât în ce priveşte transcrierea, cât şi traducerea sau modificările posttraducere.

S-au detectat ARN antisens care se adresează ARN_m specificând dihidrofolat reductaz-timidilat sintaza, secvenţe ARN complementar ARN_m pentru proteina P_{53}, ca şi ARN antisens pentru proteinele bazice din mielină.

Tehnica de transfer Southern

Identificarea unui fragment de ADN cu o anumită secvenţă se poate face prin tehnica de transfer pusă la punct de către Ed. Southern.

Etapele parcurse sunt:

1) separarea fragmentelor de dimensiuni variabile, rezultate prin acţiunea enzimelor de restricţie asupra ADN genomic, prin electroforeză în gel de agaroză (pentru fragmente de lungimi relativ mari ~20 Kb);

2) gelul, conţinând fragmentele de ADN separate, este imersat într-o soluţie de NaOH 0,5N, care produce denaturarea acestuia, şi apoi neutralizat;

3) ADN monocatenar rezultat este transferat de pe gelul fragil pe un filtru de nitroceluloză sau nylon, care are calitatea de a fixa ferm monocatenele ADN. Acest

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

transfer (the blot transfer technique sau Southern blot), se realizează prin capilaritate la forţă ionică mare; gelul acoperit cu filtrul de nitroceluloză, peste care se adaugă un „teanc" de hârtii absorbante, este plasat pe o hârtie, de asemenea absorbantă, imersată într-o soluţie salină concentrată. Hârtiile absorbante „trag" soluţia din gel odată cu ADN; pentru rapiditate, se lucrează sub vacuum. ADN eluat din gel se fixează pe nitroceluloză, ca replică exactă a acestuia. Monocatenele ADN, legate la nitroceluloză exact în poziţia în care se aflau pe gel, sunt fixate prin iradiere în ultraviolet sau prin creşterea temperaturii (~80°C);

4) se incubează replica nitrocelulozică cu o sondă radioactivă (^{32}P), de asemenea, monocatenară, în condiţii care favorizează hibridizarea;

5) se îndepărtează, prin spălare, excesul de sondă radioactivă şi se realizează prin autoradiografiere, poziţia heteroduplexurilor. Revelarea unui fragment de interes se poate face şi utilizând o enzimă a cărei acţiune se soldează cu o modificare vizibilă;

6) se compară patternul de hibridizare cu gelul original şi se definesc secvenţele ADN de interes (Fig. V.27).

Această tehnică ingenioasă, permiţând detectarea unui fragment de ADN cu o anume secvenţă, poate pune în evidenţă numărul de copii în care se găseşte o genă în ADN genomic al unui ţesut, posibilele alterări ale materialului genetic, exprimate în polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie.

Hibridizarea acizilor nucleici, imobilizaţi pe membrane solide, se practică şi în cazul

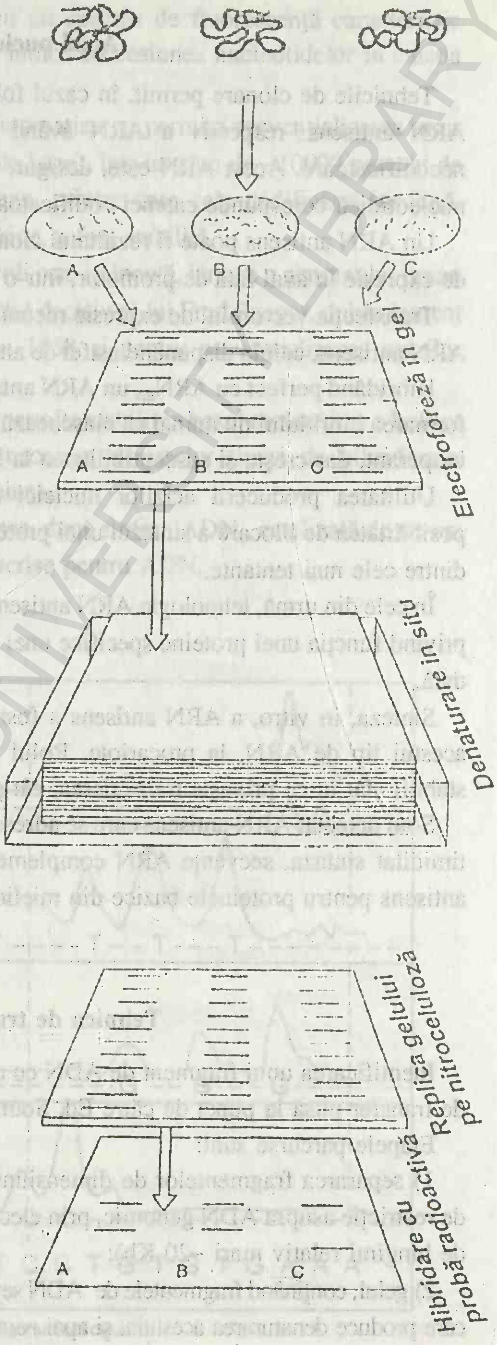


Fig. V.27 - Tehnica de transfer Southern.

detectării moleculelor de ADN recombinat în coloniile bacteriene (sau plajele de liză produse de bacteriofagi), după transferul lor din mediul de cultură.

Metoda de transfer a ADN de pe geluri pe membrane nitrocelulozice a fost extinsă şi la ARN, fiind denumită, colocvial, drept tehnica de transfer Northern, făcându-se astfel sugestia analogiei conceptuale cu tehnica Southern. Practic, analogia nu este perfectă întrucât ARN nu se leagă la filtrul de nitroceluloză în condiţiile în care o face ADN şi, în plus, este susceptibil la hidroliză alcalină; imobilizarea pe filtru nitrocelulozic este posibilă numai dacă electroforeza în gel de agaroză se efectuează în condiţii de denaturare (incluzând în gelul de agaroză formaldehida, de exemplu) care previne adoptarea unor structuri secundare.

Transferul unor proteine, separate electroforetic, de pe geluri de poliacrilamidă pe nitroceluloză, îşi propune identificarea imunochimică a uneia dintre ele, în speţă, prin utilizarea unor anticorpi specifici.

Tehnica de transfer a proteinelor a fost denumită, cu umor, tehnica Western.

Utilizarea tehnicii de transfer Southern în depistarea polimorfismului fragmentelor de restricţie

Cromozomii umani homologi, ca şi segmente ADN homoloage de la indivizi diferiţi, prezintă diferenţe (moştenite) în secvenţa nucleotidelor. Acestea apar cu o frecvenţă de unu la câteva sute de perechi de baze (~ de 10^7 ori/genom) şi constau in deleţii, inserţii ample sau numai în mutaţii punctiforme; modificările nu se traduc prin boală în situaţia în care sunt prezente în regiuni necodificatoare sau se produc în regiuni ale unor gene neesenţiale funcţiei acestora (variaţii genetice).

O mutaţie în secvenţele nucleotidice cuprinzând situsuri specifice pentru acţiunea unei anumite enzime de restricţie poate avea ca rezultat abolirea unora dintre ele, fapt ce se reflectă în dimensiunile diferite ale fragmentelor de ADN rezultate prin hidroliză. Este uşor de imaginat reciproca — o mutaţie într-o secvenţă nucleotidică poate crea un situs suplimentar de recunoaştere pentru o anume enzimă de restricţie.

O diferenţă moştenită în patternul de restricţie este desemnată drept „polimorfismul fragmentelor de restricţie" (RFLP=restriction fragment length polimorfism); ea s-a dovedit extrem de utilă diagnosticului, când polimorfismul este intragenic şi deficitul funcţional într-o boală ereditară nu este cunoscut.

Separarea prin electroforeză, pe criteriul lungimii fragmentelor de restricţie, urmată de aplicarea tehnicii de transfer Southern, permite evidenţierea polimorfismului prin utilizarea unei sonde anume.

Detectând RFLP, tehnica Southern este deja o tehnică de rutină în depistarea şi screeningul bolilor genetice umane, utilizându-se şi în diagnosticul prenatal al acestora, alături de alte tehnici, cum ar fi: hibridizarea imperfectă, secvenţializarea genomică etc.

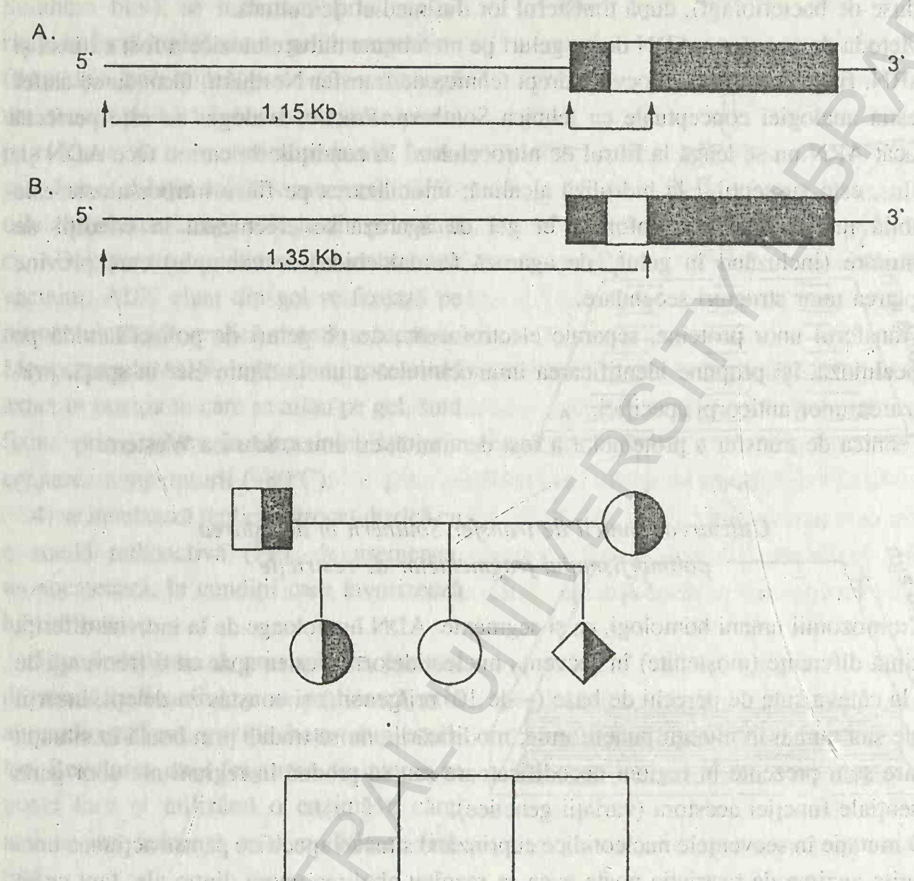


Fig. V.28 - Utilizarea polimorfismului fragmentelor de restricţie în depistarea prenatală a anemiei falciforme

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vom ilustra utilitatea acestei tehnici în cazul anemiei falciforme, datorată, aşa cum se ştie, unei mutaţii punctiforme (A substituie T în catena matriţă) în codonul specificând cel de-al şaselea aminoacid de la capătul aminoterminal al globinei, soldată cu înlocuirea glutamatului cu valina.

Enzima de restricţie Mst II, care recunoaşte şi taie secvenţa CCTGAGG din catena codificatoare normală, nu mai recunoaşte secvenţa modificată CCTGTGG, abolindu-se astfel un situs de restricţie

— CC↓TGAGG —   mutaţie →   — CCTGTGG —

— GGACT↑CC —   — GGACACC —

În gena normală pentru β globină (A), digestia cu Mst II produce fragmente de 1150, respectiv 200 de perechi de baze, în timp ce în gena anormală (B) rezultă un singur fragment de 1350 perechi de baze.

Tăierea cu Mst II şi utilizarea unei sonde corespunzând genei pentru β globină permite să se distingă între indivizii normali, homo şi heterozigoţi.

Pentru stabilirea diagnosticului prenatal la un copil provenit din părinţi heterozigoţi, probe de ADN fetal (din lichidul amniotic) şi parental, taiate cu Mst II, sunt analizate prin tehnica de transfer Southern. Admiţând că fetusul prezintă un pattern de restricţie din care lipseşte fragmentul de 1350 baze, existent la ambii părinţi, se poate conchide că acesta nu a moştenit boala de la părinţii săi heterozigoţi şi nici nu este purtător al acesteia (Fig. V.28).

De remarcat că, din numărul mare de gene sau fragmente ADN extragenic clonate, un procent semnificativ (peste 40%) prezintă, cel puţin, unul sau mai multe RFLP.

Este stabilit că numărul de secvenţe repetitive, în tandem, între două situsuri de recunoaştere pentru o enzimă de restricţie, variază de la cromozom la cromozom, de la individ la individ (cu o transmitere strict mendeliană). Acest tip de polimorfism face ca cei mai mulţi indivizi să genereze un număr diferit de fragmente, de mărimi diferite, pentru fiecare membru al unei perechi de cromozomi.

Utilizarea unei sonde (sau şi mai bine a mai multora) care recunoaşte unele secvenţe de ADN necodificatoare, intragenice, relevă patternul diferit al benzilor electroforetice.

Medicina legală se serveşte de acest poliforfism în selectarea vinovatului din totalul de suspecţi. Folosind ca enzimă de restricţie Hinf I pentru digestia unui ADN provenit dintr-o pată de sânge găsită la locul crimei, cât şi a ADN provenit, să zicem, de la trei suspecţi, se obţin prin tehnica de transfer Southern „amprentele ADN" diferite pentru fiecare dintre cei trei indivizi. Dacă unul dintre patternurile corespunzând suspecţilor se suprapune pe patternul de restricţie al ADN din pata de sânge, identitatea vinovatului prinde contur (Fig. V.29 a).

Poliforfismul fragmentelor de restricţie intergenice tranşează, chiar, şi în disputele de paternitate (Fig. V.29 b).

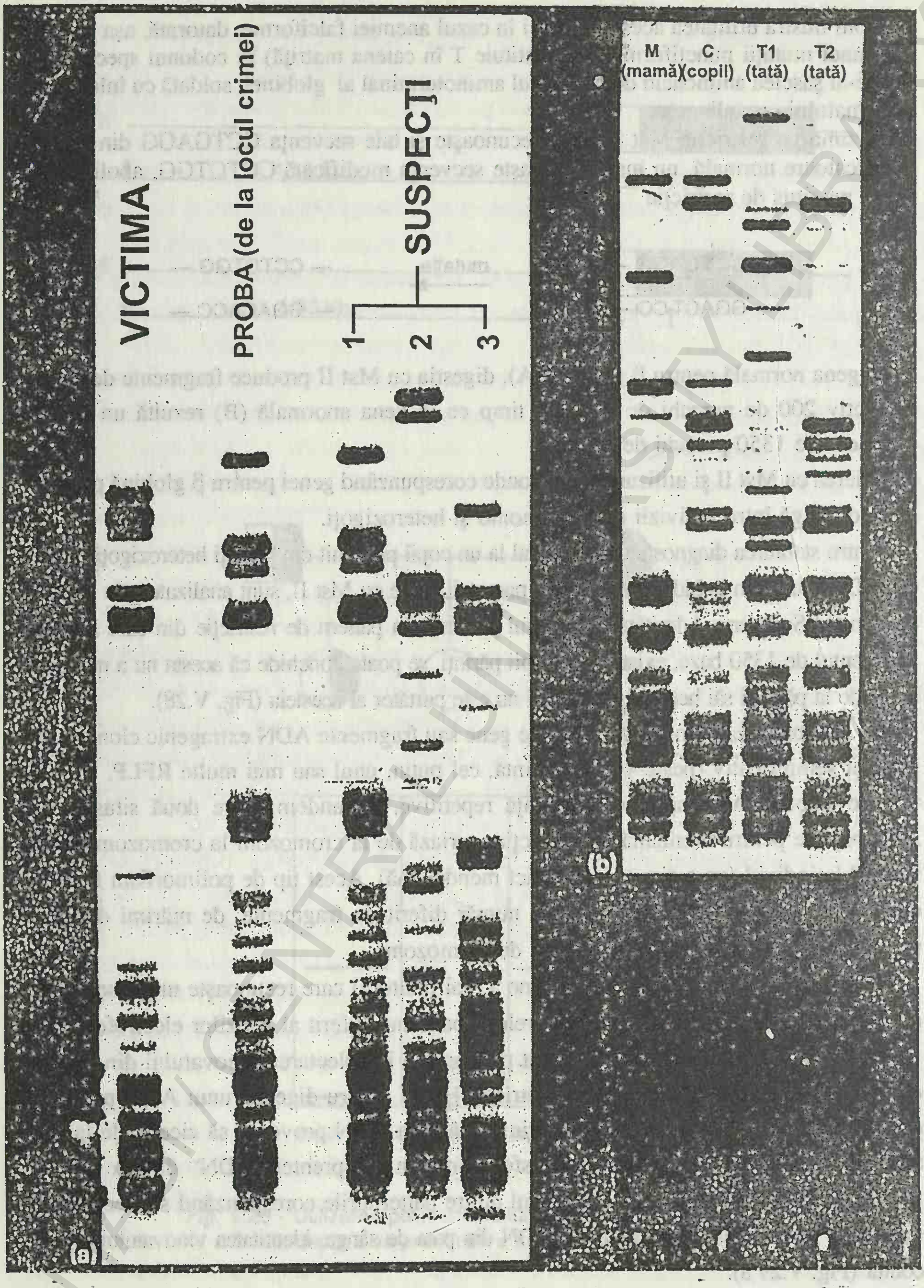


Fig. V.29 - RFLP în medicina legală (a) şi în disputele de paternitate (b).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAP. VI. ENERGETICA BIOCHIMICĂ

VI.1. ASPECTE GENERALE

Existenţa organismelor vii este condiţionată de un consum însemnat şi continuu de energie. Celula, unitatea de bază a acestor organisme, este, din punct de vedere termodinamic, un sistem foarte puţin stabil; numai un consum permanent de energie îi permite să-şi menţină ordinea complexă a structurii sale fragile şi să-şi îndeplinească funcţiile specializate.

Studiul aprofundat al desfăşurării proceselor energetice în lumea vie, cu contrubuţia esenţială a biochimiei, a condus la două concluzii majore:

a) conceptele şi principiile termodinamicii clasice îşi păstrează valabilitatea şi în acest caz;

b) toate aspectele acestor procese au o bază moleculară.

Radiaţia solară constituie sursa primară de energie pentru toate organismele vii; după modul în care o recepţionează dar şi în funcţie de forma sub care preiau carbonul, principalul element din constituţia lor, se disting:

- organisme autotrofe, cuprinzând lumea vegetală şi o serie de microorganisme; ele utilizează drept sursă de carbon CO_2, din care, sub acţiunea radiaţiei solare, prin procesul numit fotosinteză, îşi construiesc moleculele organice complexe prin intermediul glucozei. Procesul este redat prin ecuaţia generală[1]:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{h\nu} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

În afară de autotrofele fotosintetizatoare există şi autotrofe ce utilizează energia rezultată din oxidarea anaerobă a unor substraturi anorganice (H_2S, NH_3 etc.) pentru sinteză de compuşi organici;

- organismele heterotrofe, cuprinzând lumea animală, îşi procură prin hrană compuşii complecşi (reprezentaţi de glucide, lipide şi proteine) sintetizaţi de autotrofe sau de alte heterotrofe. Degradarea acestor compuşi preluaţi din exterior, dar şi a celor proprii, constituiţi ca rezerve, la compuşi simpli este însoţită de eliberare masivă de energie. Aceste degradăari reprezintă catabolismul compuşilor respectivi. Majoritatea căilor catabolice implică participarea oxigenului molecular iar produşii finali ai lor sunt CO_2 şi H_2O. Energia eliberată în procesele catabolice este utilizată pentru sinteza de compuşi organici diverşi, ceea ce reprezintă anabolismul, dar şi pentru susţinerea a numeroase alte procese consumatoare de energie cum sunt cele mecanice (contracţia musculară), electrice (potenţiale membranare) şi altele.

Întrucât organismele autotrofe utilizează în procesul de fotosinteză CO_2 şi H_2O, adică exact compuşii pe care heterotrofele îi eliberează în cursul degradării aerobe (oxigenul necesar acestor degradări fiind obţinut tot în procesul fotosintezei), cele două tipuri de

---

[1] Întrucât fotosinteza este proprie lumii vegetale şi unor microorganisme, studiul acestui proces depăşeşte cadrul unei cărţi de biochimie medicală. Procesul este tratat în orice carte de biochimie generală.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

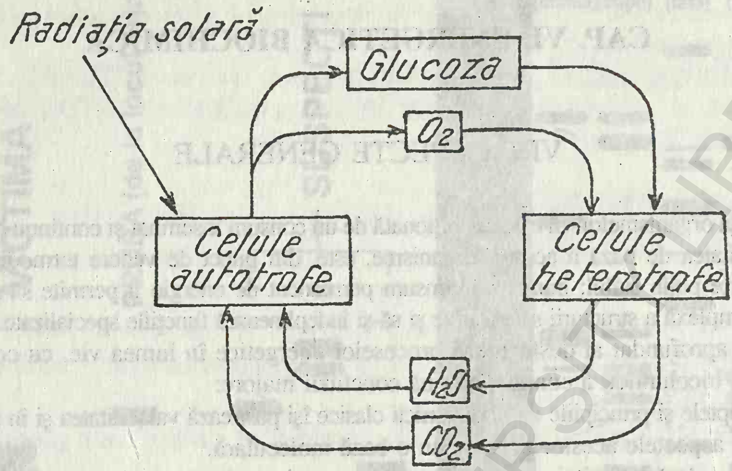


Fig. VI.1 - Dependență organismelor vii de radiația solară și interdependență organisme autotrofe-organisme heterotrofe

organisme se intercondiționează (sintrofia). În Fig. VI.1 se redă schematizat acest aspect ca și dependența tuturor organismelor vii de radiația solară.

Fără cunoașterea aspectelor esențiale ale energeticii chimice[2] care sunt prezentate în continuare, înțelegerea aprofundată a metabolismelor glucidic, lipidic și proteic nu este posibilă.

VI.2. SISTEME TERMODINAMICE. FUNCŢII DE STARE. PRINCIPIILE TERMODINAMICII.

Termodinamica, în oricare domeniu se aplică, studiază procesele energetice caracteristice ale sistemelor; ea are în vedere numai stările energetice inițială și finală, deci nu ia în considerare nici drumul parcurs nici timpul scurs la trecerea de la o stare la alta.

Sistemul este definit ca o parte a universului, separată real sau imaginar de mediul înconjurător; acesta din urmă reprezintă restul universului. Sistemul este închis dacă între el și mediul înconjurător nu se schimbă materie (dar poate avea loc schimb de energie). Dacă sistemul nu schimbă cu mediul nici materie nici energie, el se numește izolat.

[2]Deseori, în locul denumirii "energetică chimică" se utilizează termenul "bioenergetică".

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În lumea vie sistemul poate fi reprezentat de un organism întreg, un ţesut, o cultură de celule, o celulă, o secvenţa de reacţii dintr-o cale metabolică etc. Sistemele biologice sunt sisteme deschise, ele fiind traversate de fluxuri de materie şi energie.

Ca oricare alt sistem, un sistem viu se poate afla în mai multe stări. O anumită stare a sistemului este caracterizată prin valori bine definite ale unor mărimi variabile cum sunt temperatura, presiunea, numărul de moli etc., care se numesc funcţii de stare.

Când sistemul trece de la o stare la alta, o parte sau toate funcţiile de stare care îl caracterizează îşi schimbă valoarea; cum a mai fost menţionat, drumul parcurs de sistem între cele două stări poate fi oricare, ceea ce contează este ca funcţiile de stare să ajungă la noile valori. Acest espect este deosebit de important pentru energetica biochimică şi este ilustrat în continuare printr-un exemplu: glucoza poate fi transformată în CO_2 şi H_2O în două moduri:

- prin oxidare energică în bomba calorimetrică

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

- în vivo, prin intermediul unei lungi seccesiuni de reacţii dintre care unele de oxidare:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow I_1 \longrightarrow I_2 \longrightarrow I_3 \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

unde I_1, I_2, I_3 sunt intermediari.

Starea finală a sistemului este aceeaşi indiferent că CO_2 şi H_2O s-au obţinut prin prima sau a doua transformare (dacă condiţiile în care se află cei doi produşi sunt identice). În timp ce prima transformare nu are nici-o importanţă pentru organismele vii, cea de a doua este esenţială aşa cum va reieşi în continuare din acest capitol şi din capitolul de metabolism glucidic. Faptul însă că în ambele cazuri se obţine aceiaşi cantitate de energie este o dovadă a respectării legilor termodinamicii în lumea vie.

Legile termodinamicii sunt relaţiile, formulate adeseori matematic, între funcţiile de stare. La baza tuturor acestor legi stau două principii, adevăruri incontestabile reieşite din nenumărate obsrvaţii ale fenomenelor naturale, precum şi din experienţe.

Principiul I este principiul conservării energiei; formulat la modul foarte general el precizează că „În orice proces energia totală a universului se conservă". El prevede posibilitatea transformării unei forme de energie în altele, fiind formulat şi astfel: „energia nu poate fi creată nici distrusă, ea poate suferi doar transformări dintr-o formă în alta sau poate trece de la un sistem la altul".

Principiul II, numit şi principiul evoluţiei, stabileşte sensul în care au loc transformările însoţite de schimbări de energie. El statuează că „entropia universului creşte" sau, în alţi termeni că „orice transformare liberă şi spontană se face în direcţia corespunzătoare creşterii entropiei ansamblului constituit din sistem şi mediul înconjurător".

VI.3 SISTEMELE VII SUNT CARACTERIZATE CEL MAI BINE PRIN ENERGIA LIBERĂ

Faptul că principiile şi conceptele termodinamicii clasice au valabilitate şi pentru procesele energetice din sistemele vii nu înseamnă şi că mărimile (parametri de stare) care au mare valoare pentru caracterizarea unor sisteme din domeniul tehnic de exemplu (termodinamica clasică s-a dezvoltat în legătura cu funcţionarea motoarelor termice), îşi păstrează aceiaşi valoare şi pentru caracterizarea energetică a diferitelor stări ale sistemelor vii. Astfel, în timp ce trecerea între două stări energetice care se realizează în cursul funcţionării unei maşini termice este caracterizată prin variaţia entropiei (ΔS) şi entalpiei (ΔH), la trecerea de la o stare la alta a unui sistem viu variaţia lor (care, evident, are loc) este dificil sau chiar imposibil de determinat[3].

În schimb, variaţia energiei libere, notată ΔG, care matematic reprezintă diferenţa între variaţia entalpiei şi produsul variaţia entropiei x T (temperatura absolută)

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

s-a dovedit mărimea ideală deoarece:

a) reprezintă, conform definiţiei termodinamice, „acea energie care este capabilă să efectueze travaliu (lucru mecanic) asupra mediului în condiţii constante de temperatură şi presiune". Ori, menţinerea constantă a acestor parametrii caracterizează sistemele vii, în special organismele superioare;

b) valorile ei în cursul evoluţiei reacţiilor chimice pot fi obţinute cu mai puţină dificultate deoarece sunt corelate cu mărimi mult mai uşor de determinat.

Se face menţiunea că, pentru sistemele vii, în ecuaţia prezentată mai înainte ΔH este deseori înlocuit cu mărimea ΔE (variaţia energiei interne) deoarece, din motive care ţin de specificul transformărilor în aceste sisteme, $\Delta H \approx \Delta E$; deci:

$$\Delta G = \Delta E - T \cdot \Delta S$$

Din această ultimă ecuaţie rezultă că în cursul unei transformări care are loc la temperatură şi presiune constantă, pe lângă componenta capabilă să efectueze travaliu (deci o mişcare ordonată), există obligatoriu şi o componentă ($T.\Delta S$) care reprezintă o formă de energie degradată, de calitate inferioară. În opoziţie cu energia liberă, acestei părţi din energia totală i se spune „energie legată".

VI.4 VARIAŢIA ENERGIEI LIBERE ÎN REACŢIILE CHIMICE ŞI BIOCHIMICE

Aproape toate transformările care au loc în organismele vii sunt, sau au la bază, reacţii chimice; de aceea în bioenergetică interesează în mod deosebit ΔG a acestor reacţii.

Respectând convenţia de semne din termodinamică, reacţiile chimice pot fi împărţite după valoarea lui ΔG în:

---

[3]Variaţia de entropie se măsoară cu suficientă precizie doar în cazul sistemelor reprezentate de elemente chimice şi molecule mici.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) $\Delta G < 0$; reacţie „exergonică"; ea evoluează spontan de la stânga la dreapta şi poate efectua travaliu;

b) $\Delta G > 0$; reacţie „endergonică"; ea nu poate desfăşura travaliu şi necesită, pentru desfăşurarea de la stânga la dreapta, energie din exterior[4];

c) $\Delta G = 0$; reacţia este la echilibru, ea nu evoluează spontan în nici un sens.

Majoritatea reacţiilor chimice care au loc în organismele vii fac parte din „căi metabolice" care constau din secvenţe de reacţii; evident, fiecăreia dintre acestea îi corespunde o variaţie a energiei libere:

$$A \xrightarrow{\Delta G_1} B \xrightarrow{\Delta G_2} C \xrightarrow{\Delta G_3} D \xrightarrow{\Delta G_4} E \ldots\ldots$$

Fiind o mărime aditivă, energia liberă pe toată calea metabolică este:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4 \ldots.$$

Dacă $\Delta G_{total} < 0$ calea metabolică este exergonică; într-o astfel de cale nu este însă obligatoriu ca fiecare reacţie individuală să aibă $\Delta G<0$, pentru unele reacţii aceasta putând fi pozitivă. Condiţia este ca suma ΔG negative să fie mai mare în valoare absolută decât suma ΔG pozitive.

Căile exergonice sunt cele degradative (catabolice); căile de biosinteză (anabolice) sunt căi endergonice; evident, în cazul acestora, suma ΔG pozitive este mai mare în valoare absolută decât suma ΔG negative.

În sinteză, modul în care organismele vii heterotrofe îşi asigură energia este: moleculele organice complexe (glucide, lipide, proteine) preluate din hrană sunt degradate pe căi care au ΔG_{total} negative; energia liberă este utilizată pentru procesele anabolice şi pentru numeroase alte procese. Prin intermediul moleculelor complexe din hrană (dar şi a unor molecule simple) organismele heterotrofe îşi asigură totodată elementele şi compuşii chimici pe care le vor utiliza pentru sinteza de compuşi specifici. Numai o parte din energia totală a moleculelor organice complexe este utilizată aşa cum numai o parte din ele sunt folosite pentru sinteze proprii, restul fiind returnat mediului; în aceasta constă caracterul deschis al acestor sisteme.

Transferul energiei libere care se produce în cursul degradărilor către procesele consumatoare se face în organismele vii într-un mod cu totul aparte.

VI.4.1. VARIAŢIA ENERGIEI LIBERE ŞI CONSTANTA DE ECHILIBRU; ENERGIA LIBERĂ DE REACŢIE STANDARD

Cunoaşterea variaţiei energiei libere în reacţiile chimice este posibilă prin faptul că aceasta este legată de mărimi relativ uşor măsurabile: constanta de echilibru şi - în cazul reacţiilor de oxido-reducere - potenţialul redox.

Dacă energia liberă exprimă tendinţa reacţiei de a atinge echilibrul ($\Delta G = 0$), se înţelege că ΔG va fi cu atât mai mare cu cât, în starea iniţială, reacţia este mai departe

---

[4] A se face distincţia între reacţii "exergonice-endergonice" şi reacţii "exoterme-endoterme". Reacţiile sunt exergonice sau endergonice după valoarea lui ΔG şi exoterme sau endoterme după valoarea lui ΔH (variaţia căldurii).

de echilibrul ei; deci trebuie să existe o relaţie a ΔG cu concentraţia reactanţilor şi a produşilor de reacţie. Pentru reacţia generală $A + B \rightleftarrows C + D$ această relaţie este:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

unde R este constanta generală a gazelor (1,98 cal $mol^{-1}K^{-1}$), T = temperatura absolută la care se desfăşoară reacţia, [A], [B], [C] şi [D] concentraţiile reactanţilor şi ale produşilor iar ΔG^{0} o constantă numită „energie liberă de reacţie standard".

Pentru a defini pe ΔG^{0} se consideră [A] = [B] = [C] = [D] = 1M; atunci [C] [D]/[A] [B] = 0 şi $\Delta G = \Delta G^{0}$. Deci „ΔG^{0} este variaţia energiei libere în reacţie atunci când concentraţia iniţială a reactanţilor şi a produşilor de reacţie este 1 M (T = 298°K)".

Ţinând seama că la echilibru $\Delta G = 0$ şi înlocuind pe [C] [D]/[A] [B] cu K_{ech}, se obţine:

$$O = \Delta G^{0} + RT \ln K_{ech}$$

$$\Delta G^{0} = - RT \ln K_{ech}$$

Deci se poate calcula valoarea lui ΔG^{0} dacă se determină valoarea K_{ech}. În practică, plecând de la concentraţiile de 1 M a fiecărui reactant şi produs de reacţie se lasă reacţia să se desfăşoare până la atingerea echilibrului (stare staţionară); atunci se determină noile concentraţii ale lui A, B, C şi D.

Valorile lui ΔG^{0} sunt:

- negativă, $K_{ech} > 0$
- pozitivă, $K_{ech} < 0$
- 0 pentru $K_{ech} = 0$

Pentru a respecta în întregime condiţiile în care se desfăşoară reacţiile în organismele vii, în locul valorii ΔG^{0} care corespunde pH-ului imprimat de reactivi şi produşi se utilizează valoarea corectată[5] pentru pH = 7 notată $\Delta G^{\circ\prime}$. Pentru un număr foarte mare de reacţii care au loc în lumea vie aceste corecţii sunt cunoscute (se dau în tabele). Valorile $\Delta G^{\circ\prime}$ pentru diverse tipuri de reacţii sunt date în Tabelul VI.1.

Se impune înţelegerea corectă a semnificaţiilor lui $\Delta G^{\circ\prime}$ şi ΔG; $\Delta G^{\circ\prime}$ indică sensul de desfăşurare a reacţiei în condiţii standard (inclusiv pH-ul = 7) şi este o constantă, în timp ce ΔG este variaţia energiei libere în condiţiile specifice în care au loc reacţiile în organismul viu (concentraţii diferite de 1 M a reactanţilor şi produşilor de reacţie, pH diferit de 7, eventual T diferit de 298°K). Ideal ar fi ca pentru fiecare reacţie să se poată calcula ΔG care redă starea energetică reală în sistemul biologic; acest lucru este posibil în ultima vreme pentru reacţii care au loc în aşa numitele „sisteme acelulare". Pentru celelalte este utilizată valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$, care, în majoritatea cazurilor, redă suficient de corect tendinţa de evoluţie a sistemului.

[5] Cu rare excepţii, pH-ul în ţesuturi precum şi al umorilor din organismul uman este în jurul valorii de 7.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI.4.2. VARIAŢIA ENERGIEI LIBERE ÎN REACŢIILE DE OXIDO-REDUCERE. POTENŢIALUL REDOX ŞI LEGĂTURA LUI CU ENERGIA LIBERĂ

Datele din Tabelul VI.1 evidenţiază că ΔG°' în reacţiile de oxidare a glucozei şi a acizilor graşi la CO_2 şi H_2O au valori negative foarte mari. Aceste valori au fost obţinute pe glucoză şi acid palmitic care s-au oxidat în bomba calorimetrică. Dar, aşa cum s-a arătat mai înainte, aceleaşi valori ale ΔG°' totale se obţin şi prin oxidarea treptată la CO_2 şi H_2O a celor doi compuşi în vivo. În faptul că aceste valori negative ale ΔG°' sunt foarte ridicate rezidă explicaţia că oxidarea glucidelor şi a lipidelor în organismele vii este responsabilă de producerea celei mai mari părţi a energiei.

Tabelul VI.1

Valorile ΔG°' pentru câteva reacţii care au loc în organismele vii

Tipul reacţiei	*Reacţia*	*ΔG°' kcal/mol*
Oxidare	Acid palmitic +23O_2 → 16 CO_2 + 16 H_2O	- 2 338,0
Oxidare	Glucoză + 6O_2 → 6CO_2 + 6H_2O	- 686,0
Hidroliză	Zaharoză + H_2O → Glucoză + Fructoză	- 5,5
Hidroliză	ATP + H_2O → ADP + P_i	- 7,3
Hidroliză	Glucozo-6-P + H_2O → Glucoză + P_i	- 3,3
Izomerizare	Glucozo-1-P → Glucoză-6-P	- 1,7
Eliminare	Acid malic → Acid fumaric + H_2O	- 0,88
Condensare	Acid glutamic + NH_3 → Glutamină + H_2O	+ 3,4
Condensare	Glicină + Glicină → Glicilglicină + H_2O	+ 2,2

În cazul reacţiilor de oxido-reducere ΔG°' se poate calcula din relaţia care leagă această mărime de variaţia potenţialului redox standard corectat pentru pH = 7, notată $\Delta E'_o$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -n \cdot F \cdot \Delta E'_o$$

unde n este numărul electronilor cedaţi sau acceptaţi de parteneri în reacţie iar F echivalentul caloric al unui Faraday (23,62 kcal).

Valoarea lui E'_o se obţine măsurând pe E_o (Fig. VI.2) care este potenţialul redox standard al sistemului de oxido-reducere la pH = 0 şi adăugând -0,421 volţi cât reprezintă potenţialul redox al unui electrod de hidrogen în care $[H^+] = 10^{-7}$ ioni/litru faţă de electrodul normal de hidrogen.

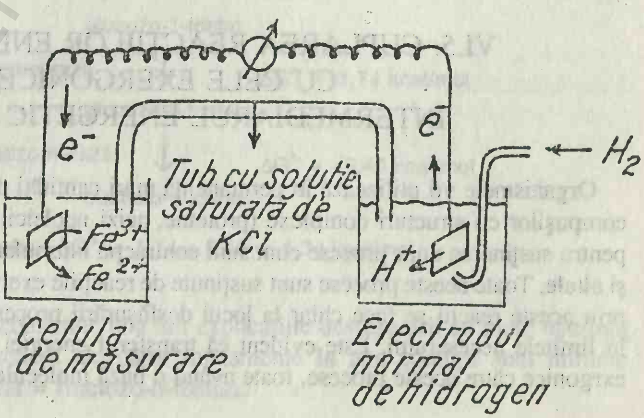


Fig. VI.2 - Determinarea potenţialului redox standard (E_o) al unui sistem de oxido-reducere. Electrodul normal de hidrogen constă dintr-o placă de platină platinată cufundată într-o soluţie de acid tare de concentraţie 1M în care se suflă un curent de H_2 la presiune de 1atm. Reacţia de oxido-reducere care are loc este $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$. Potenţialul redox al acestui electrod este, prin convenţie, zero. În celula de măsurare concentraţiile formei oxidate şi a celei reduse sunt de 1M.

Valorile E'_o pentru o serie de reacţii redox importante în biochimie se dau în Tabelul VI.2.

Tabelul VI.2

Valorile E'_o ale unor sisteme redox (determinate la temperatură între 25 - 30°C

Reacţia de electrod	E'_o *volţi*
$2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$	- 0,421
α -cetoglutarat + CO_2 + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ 2 Izocitrat	- 0,380
NAD^+ + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ NADH + H^+	- 0,320
$NADP^+$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ NADPH + H^+	- 0,324
Piruvat + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ Lactat	- 0,185
Oxaloacetat + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ malat	- 0,166
Fumarat + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ succinat	- 0,031
2 cit. $c_{(ox)}$ $2e^-$ ⇌ 2 cit. $c_{(red)}$	+ 0,254
2 cit. $a_{3(ox)}$ $2e^-$ ⇌ 2 cit. $a_{3(red)}$	+ 0,385
1/2 O_2 + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ H_2O	+ 0,816

În afara posibilităţilor ce le oferă pentru calculul lui ΔG°', valorile potenţialelor redox standard sunt utile şi în stabilirea sensului de curgere a electronilor în sisteme conţinând mai multe cupluri de oxidoreducere (vezi „Lanţul respirator"); ca şi în cazul lui ΔG°', valoarea informaţională a lui E'_o este limitată la condiţiile standard. Potenţialul redox al unui sistem care nu se află în condiţii standard se calculează cu ajutorul relaţiei:

$$E = E'_0 + \frac{R \cdot T}{n F} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

unde R, T n şi F sunt constantele întâlnite şi anterior, [Ox] şi {Red} reprezentând concentraţiile formei oxidate, respectiv reduse.

VI.5. CUPLAREA REACŢIILOR ENDERGONICE CU CELE EXERGONICE; INTERMEDIARUL ENERGETIC COMUN

Organismele vii utilizează în permanenţă mari cantităţi de energie atât pentru sinteza compuşilor cu structuri complexe (proteine, acizi nucleici, lipide, zaharide etc.), cât şi pentru susţinerea unor procese cum sunt contracţia musculară, excitaţia, transportul activ şi altele. Toate aceste procese sunt susţinute de reacţiile exergonice. Eliberarea de energie prin aceste reacţii se face chiar la locul desfăşurării proceselor consumatoare şi numai în limitele necesarului. Este evident că transferul energiei libere rezultată din reacţiile exrgonice către aceste procese, toate având o bază moleculară, trebuie să se realizeze cu

mare eficienţă. La organismele superioare, constanţa temperaturii face ca acest transfer să fie posibil numai pe calea „cuplajului": două reacţii sunt cuplate dacă energia liberă a uneia, care este exergonică, susţine desfăşurarea celeilalte, care este endergonică.

Sunt cunoscute două variante de cuplaj:

a) când unul dintre produşii de reacţie ai reacţiei exergonice este reactant în reacţia endergonică. Acest cuplaj nu este strict specific lumii vii, el fiind întâlnit şi în chimia organică sau cea anorganică. Un exemplu din aceste domenii este cuplarea reacţiei de hidroliză a anhidridei acetice cu sinteza acetatului de etil din acid acetic şi alcool etilic:

$$(CH_3-C{=}O)_2O + H_2O \longrightarrow 2CH_3-COOH; \qquad \Delta G^{0'} = -21{,}8\ Kcal/mol$$

$$CH_3-COOH + C_2H_5-OH \longrightarrow CH_3-COOC_2H_5; \qquad \Delta G^{0} = +4{,}7\ Kcal/mol$$

$$(CH_3-C{=}O)_2O + C_2H_5-OH \longrightarrow CH_3-COOC_2H_5 + CH_3-COOH; \qquad \Delta G^{0'} = -17{,}1\ Kcal/mol$$

În acest caz, schimbul de energie liberă se realizează prin intermediul acidului acetic a cărui formare, într-o reacţie puternic exergonică, asigură desfăşurarea celei de a doua, endergonică.

În organismele vii operează numeroase reacţii cuplate în acest mod. Ele sunt, de regulă, reacţii succesive în cadrul aceleiaşi căi metabolice. Un exemplu îl oferă două reacţii succesive care fac parte din calea de degradare a glicogenului în muşchi:

glucozo-1-fosfat $\longrightarrow$ glucozo-6-fosfat şi glucozo-6-fosfat $\longrightarrow$ fructozo-6-fosfat:

$$\text{glucozo-1-fosfat} \xrightarrow{\text{Fosfoglucomutază}} \text{glucozo-6-fosfat} \qquad \Delta G^{0'} = -1{,}74\ kcal/mol$$

$$\text{glucozo-6-fosfat} \xrightarrow{\text{Glucozofosfatizomerază}} \text{fructozo-6-fosfat} \qquad \Delta G^{0'} = +0{,}40\ kcal/mol$$

Pe ansamblu: $\Delta G^{0'} = -1{,}74 + 0{,}40 = -1{,}34$ kcal/mol

Existenţa acestor cuplaje constituie una din explicaţiile desfăşurării cu mare uşurinţă în organismele vii a unor reacţii ale căror randamente în alte condiţii sunt minime (izomerizarea glucozo-6-fosfat $\rightleftarrows$ fructozo-6-fosfat).

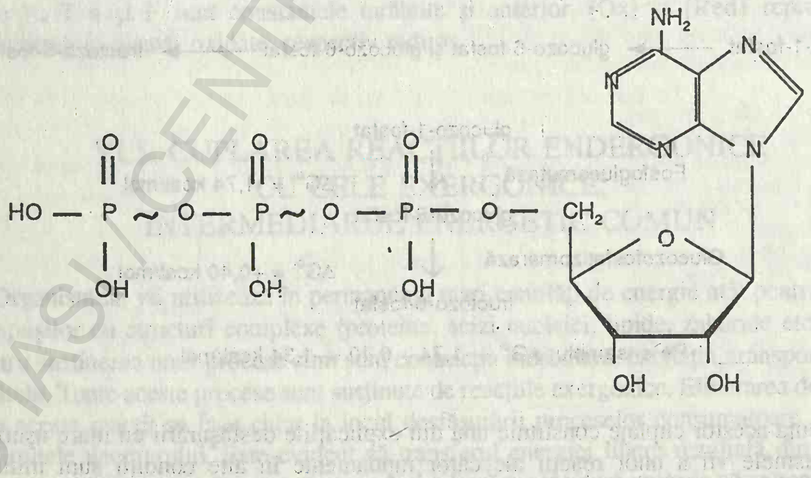
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b) cuplarea reacţiei endergonice la reacţia exergonică prin „intermediar energetic comun“ (Fig. VI.3); intermediarul comun este reprezentat de fapt de doi compuşi dintre care unul este neenergetizat (I) şi al doilea energizat I^x). Cei doi compuşi sunt interconvertibili prin absorbţie-cedare de energie liberă. Mecanismul acestui cuplaj, care asigură transferul energici libere de la reacţiile exergonice ale căilor degradative ale glucidelor, lipidelor şi proteinelor către cele mai diverse reacţii consumatoare de energie, este prezentat în continuare.

VI.6. LEGĂTURILE MACROERGICE. SISTEMUL ATP/ADP, PRINCIPALUL INTERMEDIAR ENERGETIC COMUN (COMPUS MACROERGIC)

Stările I^x şi I ale intermediarului energetic comun nu au nici o legătură cu stările excitată - neexcitată ale atomilor şi moleculelor, stări convertibile prin absorbţie-emisie de cuante de energie. I^x reprezintă un compus care are „legături macroergice“ în timp ce I este produsul reacţiei de hidroliză a lui I^x; după caz, el nu are sau mai are încă o legătură macroergică.

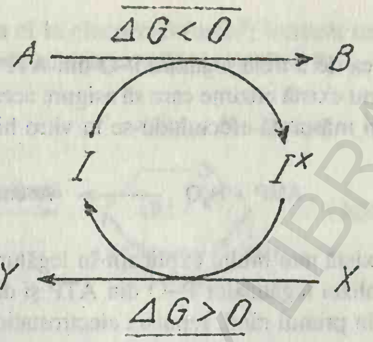
Deoarece sistemul format din ATP (acidul adenozintrifosforic), corespunzător lui I^x şi ADP (mai degrabă ADP + P_i), corespunzător lui I, constituie intermediarul energetic comun al majorităţii cuplajelor, se prezintă mecanismul funcţionării acestuia. ATP-ul ca şi alţi compuşi care au legături macroergice sunt denumiţi curent „compuşi macroergici“ deşi corect este să fie denumiţi „compuşi cu legături macroergice“. În catena ATP, care cuprinde trei resturi de acid fosforic, sunt două legături macroergice, notate ~:



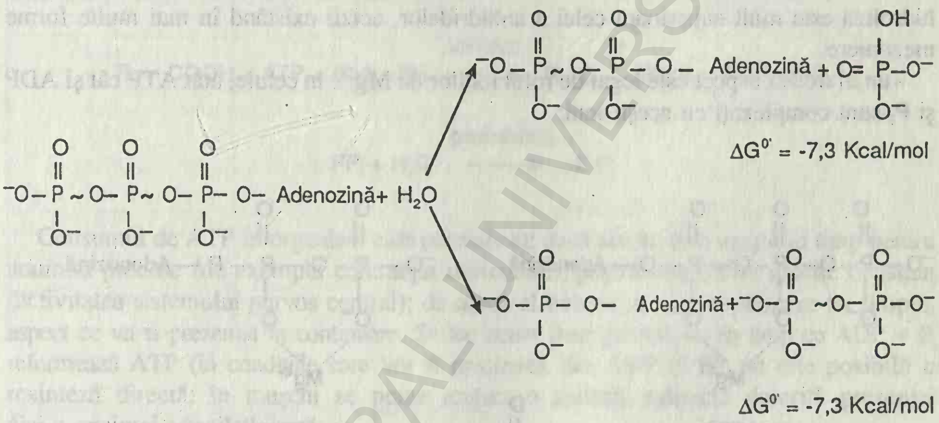
Cele două legături macroergice din ATP

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. VI.3 - Cuplarea reacţiilor endergonice cu cele exergonice prin intermediar comun



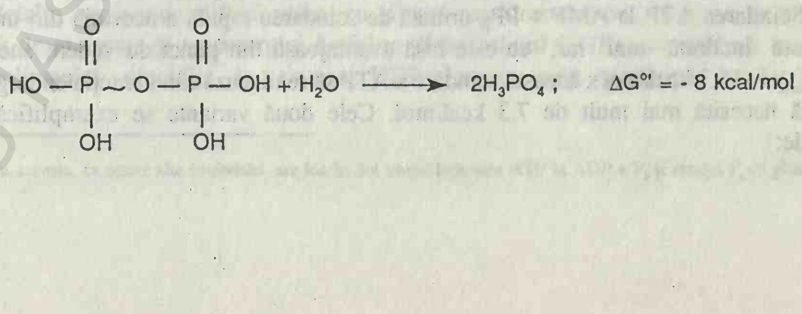
Scindarea hidrolitică a ATP (redat în forma ionizată aşa cum se află el în soluţie sau în mediul biologic), poate avea loc în două moduri: la ADP + P_i, respectiv la AMP + PP_i.



În fiecare dintre cele două scindări se rupe o legătură macroergică iar ΔG°' este de -7,3 kcal/mol; această valoare s-a luat în bioenergetică drept referinţă în sensul că legături macroergice sunt considerate acelea care prin scindare hidrolitică elibeavează cel puţin atâta energie.

Teoretic, legătura macroergică rămasă în ADP s-ar putea scinda hidrolitic şi ar elibera tot -7,3 kal/mol. În vivo, o asemenea recţie nu are loc din lipsa enzimei corespunzătoare.

În schimb, legătura macroergică din acidul pirofosforic este scindată hidrolitic extrem de rapid, în celule existând enzima pirofosfatază; energia care se eliberează este chiar ceva mai mare decât -7,3 kcal/mol.



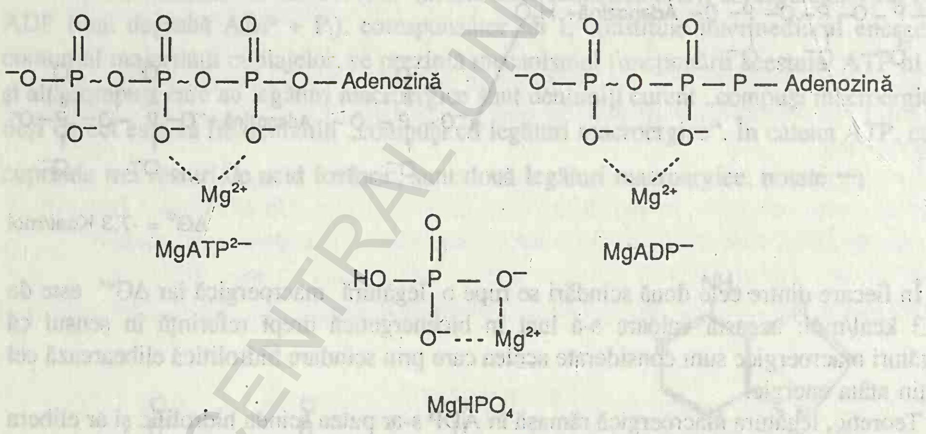
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cea de a treia legătură P-O din ATP nu este macroergică. Pe de altă parte, în celule nici nu există enzime care să asigure această scindare. ΔG°' pentru această scindare a fost totuşi măsurată efectuîndu-se în vitro hidroliza AMP.

$$AMP + H_2O \longrightarrow Adenozină + H_3PO_4 \; ; \quad \Delta G^{0\prime} = -3,4 \text{ kcal/mol}$$

Există mai multe explicaţii în legătură cu valoarea negativă ridicată a ΔG°' în cursul hidrolizei legăturilor P~O din ATP şi din pirofosfat:

- în primul rând, repulsia electrostatică: ATP, la pH-7, are patru sarcini negative care se resping mai puternic decât cele trei din ADP, respectiv cele două din acidul fosforic; situaţia este asemănătoare pentru pirofosfat în raport cu acidul fosforic;
- în al doilea rând, atât în ATP cât şi în pirofosfat legăturile cu caracter macroergic sunt de tip anhidridă (unesc două resturi acide). Stabilitatea acizilor care rezultă prin hidroliză este mult superioară celei a anhidridelor, acizii existând în mai multe forme mezomere.
- un al treilea aspect este legat de rolul ionilor de Mg^{2+}: în celule, atât ATP cât şi ADP şi P_i sunt complexaţi cu aceşti ioni:

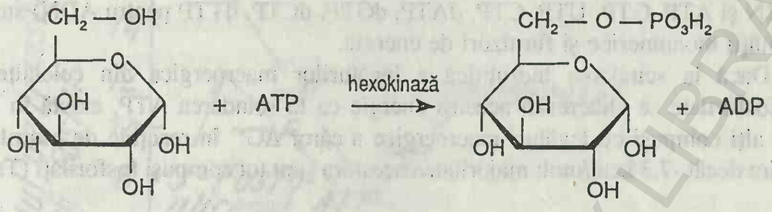


Deoarece afinitatea ADP pentru Mg^{2+} este de cca şase ori mai mare decât aceea a ATP (= $3,8.10^2$), reacţia de hidroliză este „împinsă" spre formarea de ADP şi P_i.

În cele mai multe dintre cazurile când ATP furnizează energie, el se scindează la ADP şi P_i. Scindarea ATP la AMP + PP_i, urmată de scindarea rapidă a acestuia din urmă la $2P_i$ este întâlnită mai rar, ea este însă avantajoasă din punct de vedere energetic ($\Delta G^{0\prime}_{total}$ = -15,3 kcal/mol); această scindare a ATP se realizează când reacţia endergonică cuplată necesită mai mult de 7,3 kcal/mol. Cele două variante se exemplifică prin reacţiile:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Activarea glucozei constând în fosforilarea ei la glucozo-6-fosfat[6]; întrucât reacţia necesită mai puţin de 7,3 kcal/mol, este suficientă scindarea ATP la ADP + P_i :



2. Activarea acizilor graşi, constând în trecerea lor în derivaţi acil-CoA, necesită mai mult de 7,3 kcal/mol (pentru formarea legăturii macroergice C~S); ATP se scindează în acest caz la AMP + PP_i, pirofosfatul scindându-se rapid la $2P_i$:

$$R - COOH + ATP + CoA - SH \xrightarrow{\text{tiokinaza}} R - C(=O) \sim SCoA + AMP + PP_i$$

$$PP_i + H_2O \xrightarrow{\text{pirofosfatază}} 2\ P_i$$

Consumul de ATP în organism este permanent; dacă acesta este inegal în timp pentru anumite procese (de exemplu contracţia musculară), pentru altele este practic constant (activitatea sistemului nervos central); de aceea el trebuie să se resintetizeze tot timpul, aspect ce va fi prezentat în continuare. Se fac acum doar precizările: în timp ce ADP + P_i reformează ATP (în condiţiile care vor fi precizate), din AMP şi PP_i nu este posibilă o resinteză directă; în muşchi se poate realiza o sinteză indirectă datorită prezenţei aici a enzimei adenilatkinază:

$$AMP + ATP \underset{}{\overset{\text{adenilatkinază}}{\rightleftharpoons}} 2ADP$$

Din ADP se sintetizează apoi ATP prin cuplare cu P_i

VI.7. ALŢI COMPUŞI MACROERGICI. POTENŢIALUL DE TRANSFER A GRUPĂRII FOSFAT

Celelalte nucleotide trifosforilate, cu riboză sau dezoxiriboză, servesc în anumite situaţii drept compuşi macroergici.Astfel uridintrifosfatul (UTP) este utilizat, în cadrul metabolismului glucidic, la sinteza UDP-glucozei care participă la biosinteza

---

[6] Reacţia aceasta, ca multe alte fosforitări, are loc în doi timpi: hidroliza ATP la ADP + P_i şi reacţia P_i cu glucoza.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

glicogenului, transformarea galactozei în glucoză şi altele; CTP activează unii compuşi lipidici în timp ce la sinteza proteinelor participă atât ATP cât şi GTP. În procesele de biosinteză ale acizilor nucleici nucletidele trifosforilate (ATP, GTP, UTP şi CTP pentru ARN şi ATP, GTP, UTP, CTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP pentru ADN) sunt, simultan, unităţii monomerice şi furnizori de energie.

Dacă la scindarea hidrolitică a legăturilor macroergice din celelalte nucleotide trifosforilate se eliberează aceeaşi energie ca la scindarea ATP, există în organismele vii alţi compuşi cu legături macroergice a căror ΔG°' în reacţiile de hidroliză este mai mare decât -7,3 kcal/mol; majoritatea acestora sunt tot compuşi fosforilaţi (Tabelul VI.3):

Tabelul VI.3

ΔG°' în reacţiile de hidroliză ale unor compuşi macroergici (fosforilaţi sau de altă natură) şi ale unor compuşi fosforilaţi care nu sunt macroergici

Compusul	Δ G°'	
	kcal/mol	*kJ/mol*
Acidul fosfoenolpiruvic	- 14,8	-61,9
Carbamilfosfatul	- 12,3	- 51,4
Acidul 1,3-bisfosfogliceric	- 11,8	- 49,3
Creatinfosfatul	- 10,3	- 43,1
Acil - CoA	- 7,5	- 31,4
ATP → ADP +P_i	- 7,3	- 30,5
Glucozo-1-fosfatul	- 5,0	- 20,9
Fructozo-6-fosfatul	- 3,8	- 15,9
Glucozo-6-fosfatul	- 3,3	- 13,8
Glicerol-3-fosfatul	- 2,2	- 9,2

Din dispunerea pe baza ΔG°' a ATP într-o poziţie de mijloc în raport cu ceilalţi compuşi fosforilaţi reiese şi mai bine rolul său de intermediar energetic („monedă de schimb"). Orice compus macroergic fosforilat (dar şi nefosforilat) cu ΔG°' negativ mai mare de 7,3 kcal/mol poate transfera teoretic restul de acid fosforic ADP-ului pentru a se forma ATP; acesta din urmă este, la rândul său, capabil să transfere restul de acid fosforic pe compuşi cu ΔG°' negativ mai mic decât 7,3 kcal/mol. Se realizează astfel o scară de transfer a restului de acid fosforic numită „potenţial de transfer a grupării fosfat" (sau potenţial de fosforilare) care are o mare importanţă în bionergetică. Pentru ca aceste transferuri să se producă în realitate, este obligatorie existenţa enzimelor specifice. Lipsa enzimelor specifice face imposibile transferurile fosfatului între compuşii situaţi deasupra ATP în Tabelul VI.3, sau între acil~CoA şi ATP; din acelaşi motiv nu este posibilă nici transferarea fosfatului de la compuşii de deasupra ATP către cei dedesubtul acestuia.

Fosforilarea ADP cu P_i furnizat de compuşii macroergici ca fosfoenolpiruvatul şi acidul 1,3 bisfosfogliceric reprezintă, aşa cum va reieşi în continuare, una din modalităţile de sinteză a ATP în sistemele vii.

Deosebit de importantă este relaţia dintre ATP şi creatinfosfat. Acesta din urmă se poate acumula în anumite limite în muşchi constituindu-se ca o „rezervă" de legături macroergice.

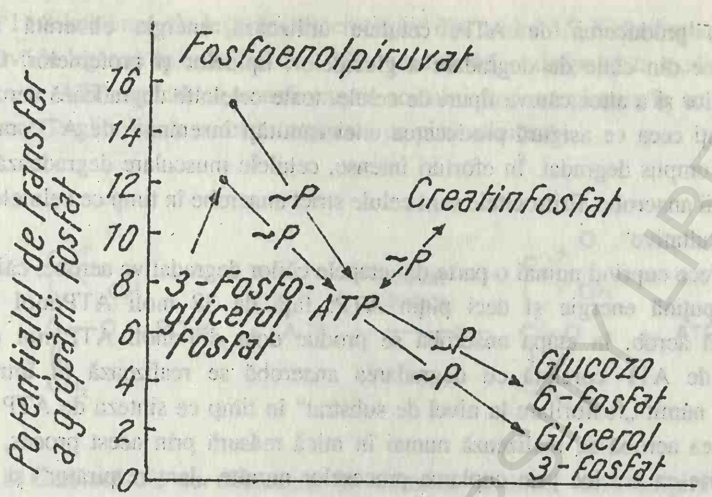
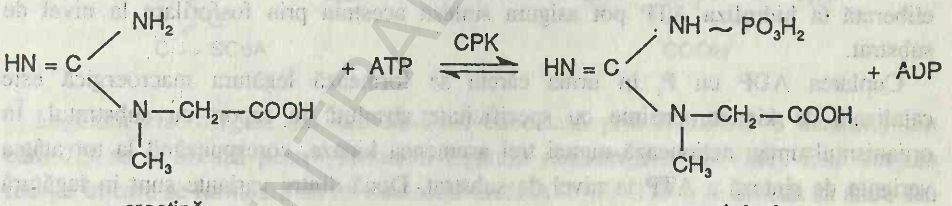


Fig. VI.4 - Transferul grupării fosfat de la compuşi macroergici cu ΔG°' negativ mai mare decât -7,3 kcal/mol la ATP şi de la acesta la alţi compuşi

Depozitarea se face în starea de repaos şi în condiţiile excesului de ATP. Creatinfosfatul serveşte pentru furnizarea rapidă de ATP în momentul contracţiei, sinteza obişnuită de ATP necesitând un timp mai îndelungat. Sinteza şi utilizarea creatinfosfatului în muşchi se fac prin intermediul reacţiei reversibile catalizată de creatinkinază, numită şi creatinfosfokinază (CK, CPK):



creatină creatinfosfat

Potenţialul de transfer a grupării fosfat şi relaţia ATP-creatinfosfat sunt reprezentate în Fig. VI.4.

Se face precizarea că acidul fosfoenolpiruvic, creatinfosfatul şi acetil~CoA (în general acil~CoA) au legături macroergice deşi nu sunt anhidride. ΔG°' negativ ridicat în reacţiile de hidroliză a lor îşi are explicaţia în stabilizarea prin rezonanţă a produşilor rezultaţi.

VI.8 CĂILE DE SINTEZĂ ALE ATP ÎN VIVO

S-a mai menţionat că, din punct de vedere energetic, fiecare ţesut, chiat fiecare celulă, acţionează pe cont propriu, În alţi termeni, nu există posibilitatea transferului de energie liberă şi nici de compuşi cu legături macroergice de la o celulă la alta.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru producerea de ATP, celulele utilizează energia eliberată în reacţiile exergonice din căile de degradare a glucidelor, lipidelor şi proteinelor. Cu excepţia eritrocitelor şi a altor câteva tipuri de celule, toate celelalte degradează aerob compuşii menţionaţi ceea ce asigură producerea unei cantităţi însemnate de ATP raporat la un mol de compus degradat. În eforturi intense, celulele musculare degradează glucoza şi în condiţii anaerobe. Eritrocitele sunt celule strict anaerobe în timp ce celulele musculare sunt „facultative".

Deoarece cuprind numai o parte din etapele căilor degradative aerobe, căile anaerobe produc puţină energie şi deci puţin ATP: faţă de 38 moli ATP/mol de glucoză degradată aerob, în etapa anaerobă se produc doar doi moli ATP/mol de glucoză. Sinteza de ATP corelată cu degradarea anaerobă se realizează în întregime prin procesul numit „fosforilare la nivel de substrat" în timp ce sinteza de ATP corelată cu degradarea aerobă se realizează numai în mică măsură prin acest proces, în cea mai mare parte ea are loc prin cuplarea proceselor numite „lanţ respirator" şi „fosforilare oxidativă".

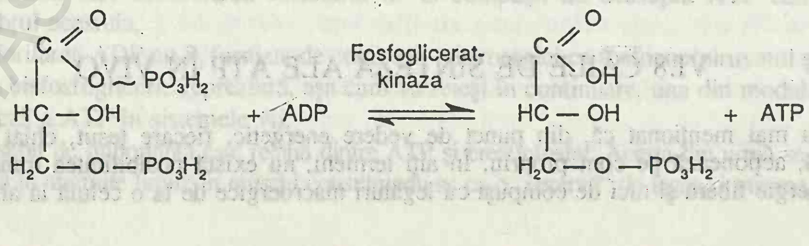
VI.8.1. FOSFORILAREA LA NIVEL DE SUBSTRAT

Energia eliberată într-o reacţie exergonică poate fi utilizată direct pentru sinteza de ATP din ADP şi P_i; se spune, în acest caz, că ATP s-a obţinut prin „fosforilare la nivel de substrat".

Numai reacţiile exergonice care eliberează energie în valoare cel puţin egală cu cea eliberată la hidroliza ATP pot asigura sinteza acestuia prin fosforilare la nivel de substrat.

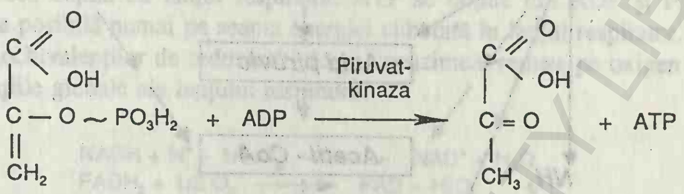
Cuplarea ADP cu P_i în urma căreia se formează legătura macroergică este catalizată de kinaze, enzime cu specificitate absolută în raport cu substratul. În organismul uman acţionează numai trei asemenea kinaze, corespunzând la tot atâtea variante de sinteză a ATP la nivel de substrat. Două dintre variante sunt în legătură directă cu degradarea glucozei la acid piruvic fiind operaţionale atât în condiţii anaerobe cât şi aerobe; cea de a treia este corelată cu catabolizarea acetil-CoA în ciclul acizilor tricarboxilici:

1. Sinteza de ATP cuplată cu transformarea acidului 1,3-bisfosfogliceric în acid 3-fosfogliceric; este una dintre reacţiile glicolizei fiind catalizată de fosfogliceratkinază:



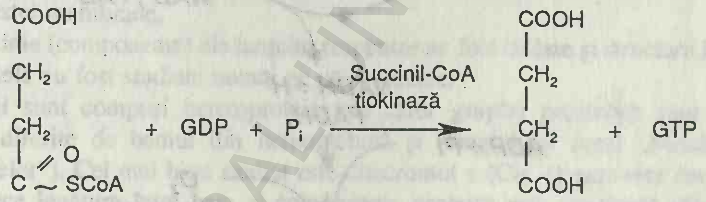
Din cele 11,8 kcal/mol ale legăturii macroergice din acidul 1,3-bisfosfogliceric doar 7,3 se conservă în legătură macroergică din ATP, restul de 4,5 se disipează în mediu.

2. Sinteza de ATP cuplată cu transformarea acidului fosfoenopiruvic în acid piruvic este o altă reacţie glicolitică; ea este catalizată de piruvatkinază:



Cele 14,8 kcal/mol cât se eliberează la hidroliza acidului fosfoenolpiruvic ar fi suficiente pentru sinteza a doi moli de ATP; în realitate se formează numai unul, 7,5 kcal/mol disipându-se în mediu.

3. Sinteza de ATP cuplată cu transformarea succinil-CoA în acid succinic; este una dintre reacţiile ciclului acizilor tricarboxilici fiind catalizată de succinil-CoA-tiokinază:



Legătura macroergică din succinil-CoA eliberează prin hidroliză -8 kcal/mol din care 7,3 se utilizează pentru formarea legăturii macroergice din GTP. Este singura reacţie în care se formează un alt nucleotid decât ATP-ul; GTP este utilizat ca atare sau este transformat prin reacţie de schimb în ATP:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

VI.8.2. LANŢUL RESPIRATOR ŞI FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Rolul catabolic al ciclului acizilor tricarboxilici este de a degrada restul acetil din acetil-CoA care se obţine prin degradări specifice ale glucidelor, lipidelor şi unora dintre aminoacizi. În cursul acestei degradări, carbonii din restul acetil sunt oxidaţi la CO_2 iar hidrogenii sunt preluaţi de coenzimele NAD^+ şi FAD care se reduc la $NADH + H^+$,

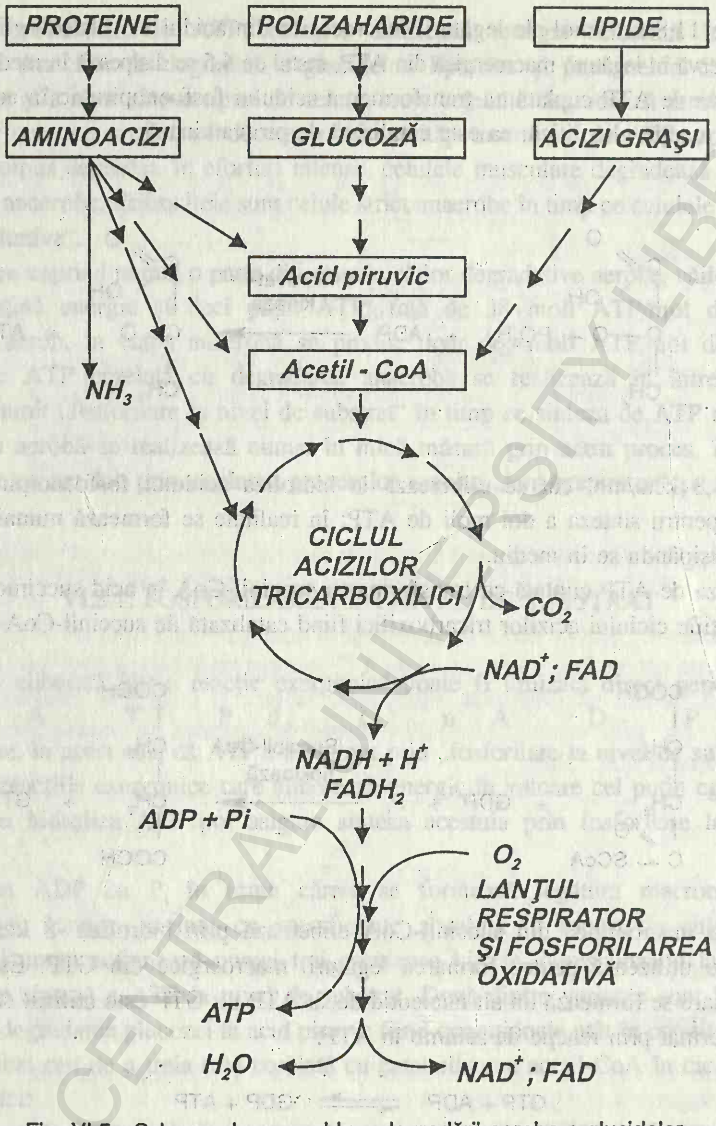


Fig. VI.5 - Schema de ansamblu a degradării aerobe a glucidelor, lipidelor şi proteinelor

respectiv $FADH_2$ (vezi „Ciclul acizilor tricarboxilici") (Fig. VI.5). Coenzimele reduse $NADH + H^+$ şi $FADH_2$ se formează şi în cursul degradărilor specifice ale glucidelor (de exemplu în glicoliză), lipidelor (β-oxidarea acizilor graşi) şi unor aminoacizi.

Lanţul respirator, etapa ultimă a degradării aerobe, are drept scop reoxidarea coenzimelor $NADH + H^+$ şi $FADH_2$ prin trecerea hidrogenului pe oxigen cu formarea apei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin reoxidarea coenzimelor se asigură:

a) posibilitatea continuării dehidrogenărilor în căile degradative specifice şi în ciclul acizilor tricarboxilici;

b) eliberarea unei cantităţi de energie care serveşte la sinteza celei mai mari părţi din ATP-ul necesar organismului;

Sinteza propriu zisă de ATP se realizează prin procesul numit „fosforilare oxidativă", proces cuplat cu lanţul respirator; ATP se obţine din ADP şi P_i a căror condensare este posibilă numai pe seama energiei eliberată în lanţul respirator.

Transferul „echivalenţilor de reducere"[7] de pe coenzimele reduse pe oxigen poate fi redat prin ecuaţiile globale ale lanţului respirator:

$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$$
$$FADH_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow FAD + H_2O$$

Acest transfer se face însă printr-un număr mare de reacţii intermediare (lanţ) catalizate de enzime specifice care acţionează individual sau în complexe; corespunzător, energia totală a fiecăreia din cele două reacţii se eliberează în trepte sau „pachete" cu valori ale ΔG^{0}' sub sau uşor peste -7,3 kcal/mol, ultimele utilizabile pentru sinteza ATP din ADP şi P_i.

Lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă se desfăşoară în membrana internă a mitocondriilor, toate enzimele care catalizează cele două procese fiind integrate în structura acestei membrane.

Multe enzime (componente) ale lanţului respirator au fost izolate şi structura lor a fost elucidată; altele au fost studiate numai pe căi indirecte.

Citocromii sunt compuşi heteroproteici ale căror grupări prostetice sunt hemuri, foarte uşor diferite de hemul din hemoglobină şi mioglobină (vezi „Metabolismul hemoproteinelor"). Cel mai bine studiat este citocromul c (Cit. c) care este deosebit de stabil deoarece legătura între hem şi componenta proteică este covalentă (Fig. VI.6). O proprietate deosebit de importantă a citocromilor este absorţia selectivă a unor radiaţii din domeniul vizibil al spectrului radiaţiilor electromagnetice; clasificarea citocromilor în a, b, c etc. (fiecare cu mai multe variante, notate prin indici 1, 2, 3 ...) s-a realizat după acest criteriu.

Mecanismul prin care fiecare dintre citocromi acţionează în lanţul respirator constă în acceptarea electronilor de la un partener cu potenţial redox standard mai negativ (sau pozitiv mai mic) decât al său şi cedarea apoi a acestor electroni către un partener cu potenţial electronegativ mai mic (sau electropozitiv mai mare) (Fig. VI.7). În cursul funcţiei lor, citocromii îşi schimbă deci alternativ valenţa fierului între Fe^{3+} şi Fe^{2+}. Această însuşire este total diferită de a mioglobinei şi hemoglobinei la care valenţa fierului nu se modifică odată cu fixarea O_2; aa se explică nu numai prin diferenţa structurii hemului din citocromi ci şi prin componentele proteice diferite.

---

[7]După cum se va vedea în continuare, în unele reacţii ale lanţului respirator se transferă hidrogeni, în altele electroni. Termenul "echivalenţi de reducere" este comun pentru cele două transferuri.

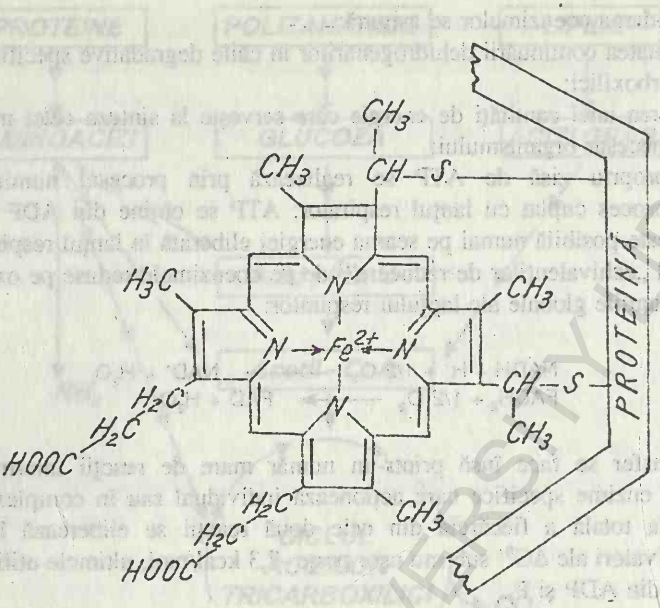


Fig. VI.6 - Structura citocromului ç (componenta neproteică). Legătura cu proteina specifică se face prin intermediul grupărilor -SH ale unor resturi de cisteină

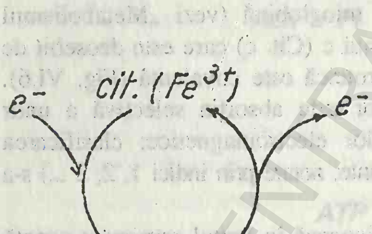


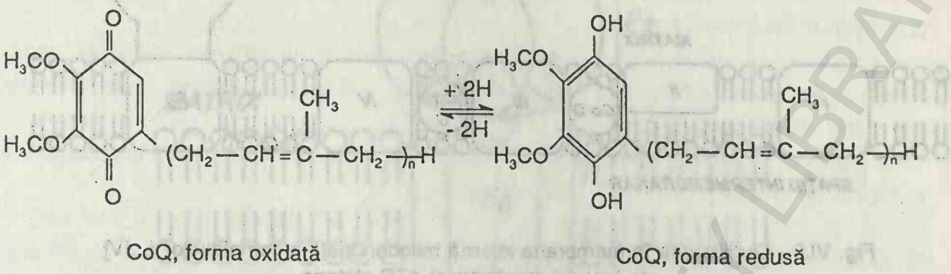
Fig. VI.7 - Modul de funcţionare a citocromilor în lanţul respirator (detalii în text)

Citocromii a şi a_3, unităţi distincte după spectrele de absorbţie înregistrate pe fragmente de membrană internă mitocondrială, nu au putut fi totuşi separaţi unul de altul. Împreună ei alcătuiesc citocrom-c-oxidaza, singurul dintre componentele lanţului respirator care este capabil să reducă oxigenul.

Coenzima Q (CoQ), numită şi ubichinonă, seamănă structural şi funcţional cu vitaminele K. Sunt cunoscute variante ale CoQ care diferă prin lungimea catenei izoprenoide; fiecare dintre acestea există în formă redusă şi în formă oxidată;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

funcţia lor în lanţul respirator se bazează tocmai pe alternanţa continuă între cele două forme:



Flavoproteinele (FP) sunt componente ale lanţului respirator prin intermediul cărora se preiau hidrogenii de la coenzimele dehidrogenazelor NADH + H^+ şi $FADH_2$. Structurile diverselor flavoproteine au fost prezentate în capitolul „Vitamine şi coenzime". În lanţul respirator se întâlnesc în variantele:

- flavoproteina N, cu coenzimă FMN, notată FP_N; are rolul de a prelua hidrogenii de la coenzima NADH + H^+;
- flavoproteina S, cu coenzima FAD, notată FP_S; preia direct hidrogenul de pe acidul succinic în ciclul acizilor tricarboxilici;
- alte flavoproteine cu coenzimă FAD, care preiau hidrogenul de la diverse substrate;

Proteine cu fier şi sulf: atomii acestor elemente sunt grupaţi în „centre" care se leagă de componentele proteice prin intermediul unor resturi de cisteină (Fig. VI.8).

Aceste componente sunt dispuse secvenţial în membrana internă mitocondrială, în ordinea descreşterii potenţialului redox negativ şi creşterii celui pozitiv; cu excepţia CoQ şi Cit.c,

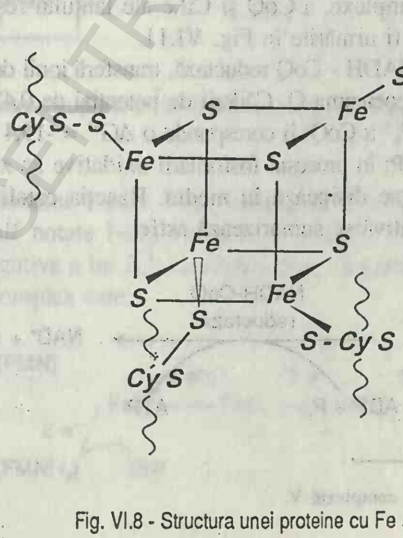


Fig. VI.8 - Structura unei proteine cu Fe şi S

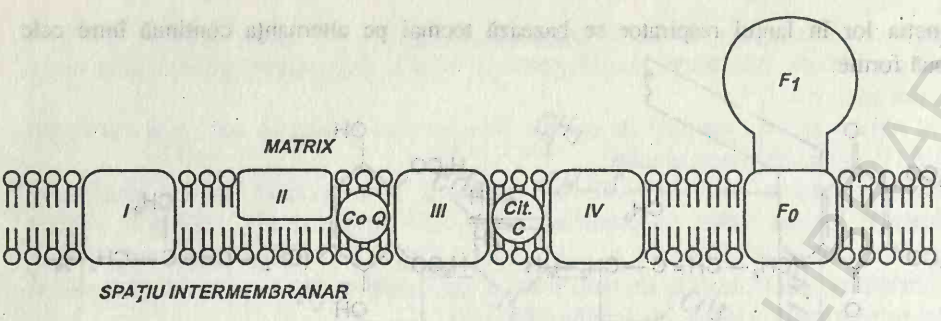


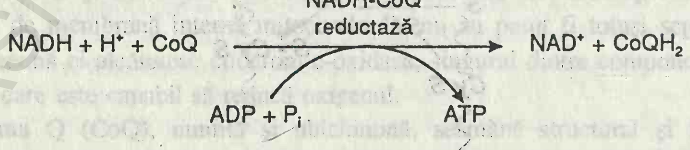
Fig. VI.9 - Localizarea în membrana internă mitocondrială a complexelor I...IV] ale lanţului respirator şi ATP sintaza

care funcţionează individual, celelalte componente se grupează în complexe notate I, II, III şi IV (Fig. VI.9) fiecare complex catalizând o anumită reacţie de oxido-reducere.

Tot în membrana internă mitocondrială, după complexul IV, este inclus (parţial) complexul responsabil de fosforilarea oxidativă numit ATP-sintază dar şi ATP-ază, deoarece, dacă este extras din membrană, el catalizează hidroliza ATP; denumiri sinonime mai sunt H^+ - ATP-ază şi F_0F_1-ATP-ază[8]. Complexul are o subunitate, notată F_0, care străbate în totalitate membrana internă; ea constă din patru tipuri de proteine care formează un sistem de pori transmembranari prin care trec cu mare uşurinţă protonii („canal protonic"). Subunitatea notată F_1 este alcătuită din cinci tipuri de proteine care se află în raportul stoechiometric $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$; ea este cuplată la subunitatea F_0 şi se află în întregime în matrixul mitocondrial sub forma unei mici sfere (Fig. VI.10). La nivelul acestei subunităţi are loc reacţia de condensare a ADP cu P_i, de aceea este denumită şi „factor de cuplare 1".

Funcţionarea celor patru complexe, a CoQ şi Cit.c ale lanţului respirator, cuplate cu funcţionarea ATP-sintazei pot fi urmărite în Fig. VI.11.

Complexul I, numit chimic NADH - CoQ reductază, transferă ionii de H^+ şi electronii de pe NADH + H^+ din matrix pe coenzima Q. Căderii de potenţial de 0,42 V, care reprezintă diferenţa între E_o' a NADH şi E_o' a CoQ, îi corespunde o $\Delta G°' = -19,4$ kcal/mol, suficientă pentru sinteza a doi moli de ATP; în procesul fosforilării oxidative se sintetizează însă un singur mol, restul de energie se disipează în mediu. Reacţia catalizată de complexul I, cuplată cu fosforilarea oxidativă se sumarizează astfel:



[8]Uneori, ATP-sintaza este denumită şi complexul V.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

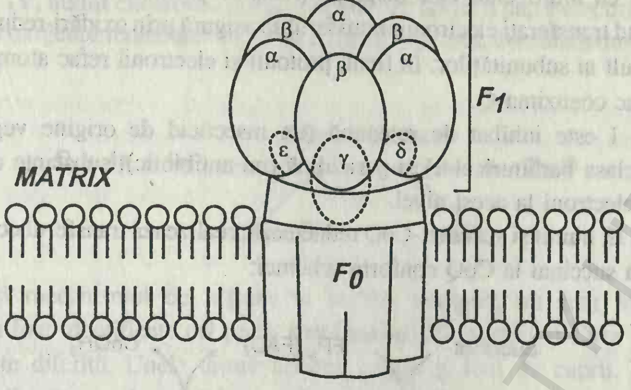


Fig. VI.10 - Un model al structurii ATP sintazei

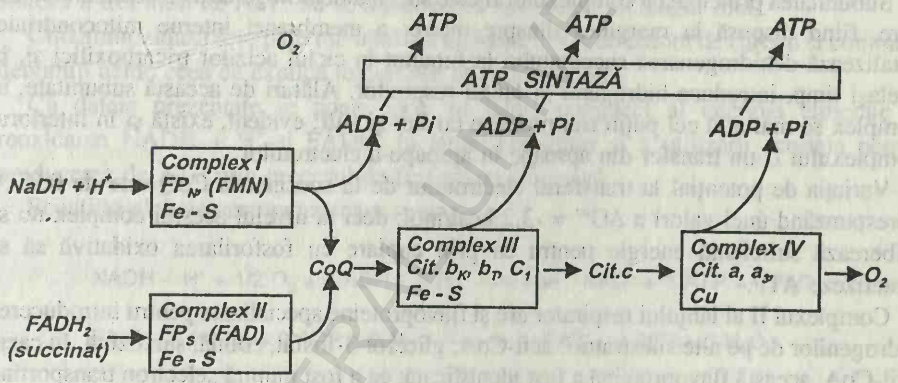
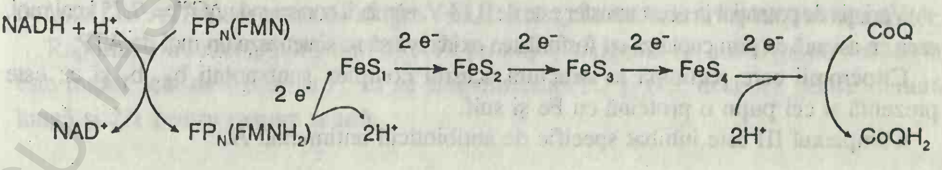


Fig. VI.11 - Funcţionarea cuplată a complexelor lanţului respirator şi fosforilării oxidative

Subunităţile complexului I sunt FP_N (numită şi NADH dehidrogenaza) şi câteva proteine cu fier şi sulf notate FeS_1, FeS_2, FeS_3 şi FeS_4, această ordine corespunzând descreşterii valorii negative a lui E_o'; corespunzător, curgerea echivalenţilor de reducere în interiorul acestui complex este:

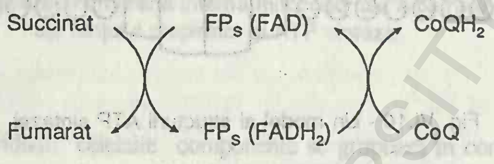


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se observă că hidrogenul este disproporționat la prelurea sa de către complex, în continuare fiind transferați electronii; transferul se asigură prin oxidări-reduceri ale ionilor de fier și de sulf ai subunităților. În final, protonii și electronii refac atomii de hidrogen și aceștia reduc coenzima Q.

Complexul I este inhibat de rotenonă (un insecticid de origine vegetală), amital (compus din clasa barbituricelor) și pericidină (un antibiotic), substanțe care blochează transferul de electroni la acest nivel.

Complexul II, numit și succinat-CoQ reductează, realizează transferul echivalenților de reducere de la succinat la CoQ conform schemei:



Subunitatea principală a complexului II este succinatdehidrogenaza cu coenzima FAD, care, fiind dispusă la marginea dinspre matrix a membranei interne mitocondriale, catalizează dehidrogenarea succinatului la fumarat în ciclul acizilor tricarboxilici și, în același timp, introduce hidrogenii în lanțul respirator. Alături de această subunitate, în complex se mai află cel puțin trei proteine cu fier și sulf; evident, există și în interiorul complexului II un transfer din aproape în aproape a electronilor.

Variația de potențial la transferul electronilor de la succinat la CoQ este de 0,07 V corespunzând unei valori a $\Delta G°' = -3{,}2$ kcal/mol; deci la nivelul acestui complex nu se eliberează suficientă energie pentru ca prin cuplare cu fosforilarea oxidativă să se sintetizeze ATP.

Complexul II al lanțului respirator are și flavoproteine specializate pentru introducerea hidrogenilor de pe alte substraturi: acil-CoA, glicerol-3-fosfat, colină, sarcozină. În cazul acil-CoA, această flavoproteină a fost identificată; ea a fost numită „electron transporting flavoprotein" (ETF).

Complexul III, numit CoQ-citocrom c reductază, asigură transferul echivalenților de reducere, tot sub formă de electroni, de la CoQ la citocromul c:

$$CoQH_2 + 2Cit.c\,(Fe^{3+}) \xrightarrow[\text{reductază}]{\text{CoQ-citocrom c}} CoQ + 2Cit.c\,(Fe^{2+}) + 2H^+$$

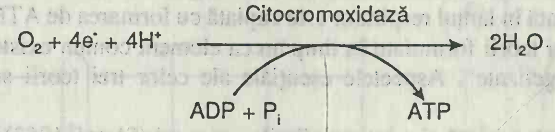
Variația de potențial la acest transfer este de 0,18 V, căreia îi corespunde $\Delta G°' = -7{,}75$ kcal/mol, ceea ce asigură ca prin cuplarea cu fosforilarea oxidativă să se sintetizeze un mol de ATP.

Citocromii care participă la structura acestui complex sunt notați b_K, b_T și c_l; este prezentă și cel puțin o proteină cu Fe și sulf.

Complexul III este inhibat specific de antibioticul antimicină A.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Complexul IV, numit citocromoxidază, catalizează adiţia a patru electroni furnizaţi de Cit.c (Fe^{2+}), la oxigenul molecular cu formarea a $2O^{2-}$; acesta, combinându-se cu protonii, formează apă:



Structura şi mecanismul de acţiune al acestui complex nu sunt încă pe deplin cunoscute. Au fost identificate cel puţin şapte subunităţi proteice a căror compoziţie în aminoacizi este diferită. Unele dintre acestea conţin şi ioni de cupru. Pe baza unor determinări indirecte, se admite că în complexe electronii recepţionaţi de la Cit.c de către Cit.a, trec de la acesta pe proteina cu cupru şi de aici pe Cit.a_3 care îi transferă apoi pe oxigen.

Căderea de potenţial la trecerea electronilor mediată de complexul IV este de 0,54 V căreia îi corespunde o valoare $\Delta G^{o\prime}$ = -24,8 kcal/mol, deci energie suficientă pentru sinteza a trei moli de ATP; nu se sintetizează însă decât un singur mol.

Citocromoxidaza este puternic inhibată de ionul CN^-, de oxidul de carbon şi compuşii denumiţi azide ceea ce explică toxicitatea mare a acestora.

Cu datele prezentate se poate face un bilanţ complect al energiei eliberate la reoxidarea NADH + H^+ şi $FADH_2$ în lanţul respirator şi a utilizării acesteia pentru producerea de ATP prin procesul de fosforilare exidativă.

Ecuaţiile globale corespunzătoare sunt:

$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 + 3\ ADP + 3\ P_i \longrightarrow NAD^+ + 3\ ATP + 4\ H_2O$$

$$FADH_2 + 1/2\ O_2 + 2\ ADP + 2\ P_i \longrightarrow FAD + 2\ ATP + 3\ H_2O$$

Variaţia potenţialului redox standard pe tot lanţul respirator este $\Delta E_0^{\prime}$ = 1,14 V pentru reoxidarea NADH + H^+, valoare rezultată din însumarea căderilor de potenţial la nivelul celor trei complexe. Aplicând formula $\Delta G^{o\prime} = - n{\cdot}F{\cdot}\Delta E_0^{\prime}$ se obţine $\Delta G^{o\prime}$ = – 52,6 kcal/mol. Întrucât se sintetizează trei moli de ATP pentru care se consumă 3×7,3 = 21,9 kcal/mol, randamentul utilizării energiei libere pentru sinteza de ATP este: 21,9×100/52,6 = 42%.

Intrarea echivalenţilor de reducere în lanţul respirator prin complexul I este numită „ramura lungă“ a acestuia; ea asigură deci formarea a trei moli de ATP/atom gram de oxigen redus.

La intrarea echivalenţilor de reducere prin complexul II se asigură formarea a numai doi moli de ATP/atom gram de oxigen redus. Este „ramura scurtă“ a lanţului respirator.

Raportul între numărul de moli de ATP produşi şi oxigenul (în atomi gram) consumat este numit „cât de fosforilare“. El se simbolizează P/O şi este deci 3/1 pentru ramura lungă şi 2/1 pentru ramura scurtă.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI.8.3. TEORII PRIVIND MECANISMUL CUPLĂRII LANŢ RESPIRATOR - FOSFORILARE OXIDATIVĂ

Una dintre problemele fundamentale ale bioenergeticii o constituie mecanismul prin care energia eliberată în lanţul respirator este cuplată cu formarea de ATP prin fosforilarea oxidativă. Cele trei teorii formulate în timp au ca element comun existenţa intermediară a unei „stări energetizate". Aspectele esenţiale ale celor trei teorii sunt prezentate în continuare.

a) Teoria chimică, numită şi a intermediarilor comuni (Slater, 1953): prin analogie cu fosforilarea oxidativă la nivel de substrat, se admite că variaţia energiei libere în cursul trecerii electronilor de la un intermediar redus (AH_2) al lanţului respirator la următorul oxidat (B) serveşte la cuplarea lui A cu un compus C pentru a forma legătura macroergică A~C. În reacţii de schimb secvenţiale, legătura macroergică este trecută în compusul C~P; de aici în ATP. În timpul acestor reacţii AH_2 este oxidat la A, B este redus la BH_2 şi C este refăcut putându-se iniţia o nouă secvenţă:

$$AH_2 + B + C \rightleftharpoons A \sim C + BH_2$$

$$A \sim C + P_i \rightleftharpoons C \sim P + A$$

$$C \sim P + ADP \rightleftharpoons ATP + C$$

Celor trei cuplaje ale lanţului respirator cu fosforilarea oxidativă ar trebui să le corespundă trei intermediari A~C; nici un asemenea compus nu a fost identificat. Abandonată din acest motiv, teoria cuplajului chimic a fost reluată (Griffith, 1977) considerându-se că acidul lipoic, care s-a constatat că este implicat în complexul ATP-azic, ar putea îndeplini rolul lui C dar nu s-a obţinut nici un fel de date experimentale care să sprijine această supoziţie.

b) Teoria conformaţională: în forma iniţială (Boyer, 1964), consideră că energia eliberată în cursul transportului electronilor este conservată prin modificarea conformaţională la o stare energizată a unuia sau mai multor transportori de electroni. Ulterior, s-a postulat modificarea conformaţională a complexelor enzimatice la care se realizează cuplajul. În sprijinul acestei teorii se aduc rezultate obţinute prin microscopia electronică care evidenţiază că la trecerea mitocondriilor din starea de repaos metabolic la starea activă (consum de O_2 şi sinteză de ATP), membrana internă se pliază, volumul matriceal reducându-se foarte mult. Viteza redusă a modificărilor conformaţionale în raport cu rapiditatea cuplajului transport de electroni-sinteză de ATP este un serios impediment de impunerea acestei teorii.

c) Teoria chemiosmotică (Mitchell, 1961) postulează că starea intermediară energetizată care determină sinteza de ATP din ADP şi P_i este reprezentată de gradientul de protoni care se stabileşte între faţa interioară şi cea exterioară a membranei interne mitocondriale în timpul transportului de electroni. În alţi termeni, transportul direcţionat al electronilor în lungul membranei determină un transport direcţionat (vectorial) al protonilor din interiorul mitocondriilor spre exterior (Fig. VI.12). Gradientul protonilor ejectaţi în spaţiul intermembranar are două componente: una de pH, (ΔpH)

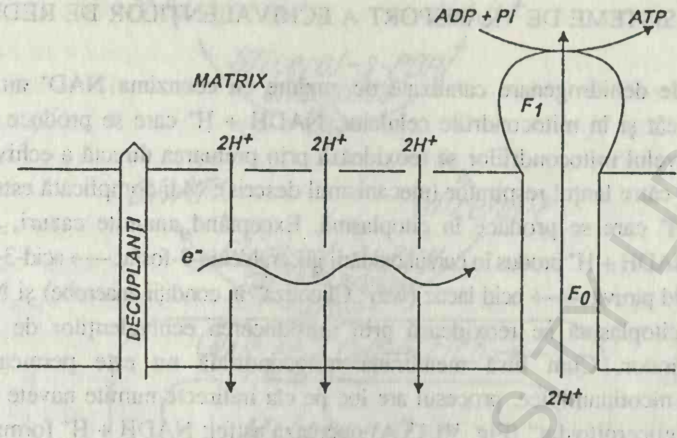


Fig. VI.12 - O ilustrare schematizată a teoriei chemiosmotice

şi una electrică sau potenţial de membrană ($\Delta\Psi$). Suma lor este numită forţă proton motrice, notată Δp:

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2{,}303\,\frac{R\cdot T}{F}\,\Delta pH$$

Numeroase date experimentale vin în sprijinul acestei teorii. Astfel existenţa unui potenţial transmembranar, care constituie cheia ipotezei chemiosmotice, are justificare prin faptul că spaţiul intermembranar al mitocondriilor este mult mai acid în cursul funcţionării celor două procese. Prin studii de microscopie electronică şi alte tehnici, s-a confirmat şi faptul, de asemenea obligatoriu pentru valabilitatea teoriei, că membrana internă mitocondrială este străbătută de la o faţă la cealaltă de complexele I, III şi IV ale lanţului respirator (Fig. VI.9).

Teoria prevede în continuare că protonii din spaţiul intermembranar revin în mitocondrie strict prin partea F_o a ATP sintetazei care este un „conductor" pentru protoni (restul membranei fiind impermeabilă pentru aceştia). Acest flux de protoni este cel care determină, la nivelul subunităţii F_1, sinteza de ATP din ADP şi P_i.

În experienţe model s-a putut demonstra că un flux artificial de protoni, în absenţa lanţului respirator, poate determina cuplarrea ADP cu P_i, ceea ce constituie încă un argument serios în favoarea teoriei chemiosmotice.

Unul dintre postulatele teoriei chemiosmotice prevede că apa rezultată în reacţia de formare a ATP din ADP şi P_i se ionizează spontan, ionii H^+ fiind dirijaţi spre interiorul mitocondriei (ei urmând să creeze gradientul protonic) în timp ce ionii OH^- sunt dirijaţi spre spaţiul intermembranar:

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H^+_{interior} + OH^-_{exterior}$$

Obligatoriu după Mitchell, acest postulat a constituit obiectul principal al unor înverşunate critici la adresa teoriei chemiosmotice; totuşi, prin argumentele experimentale deja menţionate ca şi prin altele aduse relativ recent, această teorie s-a impus net în raport cu teoria chimică şi cu cea conformaţională.

VI.8.4. SISTEME DE TRANSPORT A ECHIVALENŢILOR DE REDUCERE

Reacţii de dehidrogenare catalizate de enzime cu coenzima NAD^+ au loc atât în citoplasma cât şi în mitocondriile celulelor. $NADH + H^+$ care se produce în astfel de reacţii la nivelul mitocondriilor se reoxidează prin preluarea directă a echivalenţilor de reducere de către lanţul respirator (mecanismul descris). Mai complicată este reoxidarea $NADH + H^+$ care se produce în citoplasmă. Exceptând anumite cazuri, de exemplu reoxidarea $NADH + H^+$ produs în cursul oxidării gliceraldehid-3-fosfat ---→ acid-3-fosfogliceric în reacţia acid piruvic ---→ acid lactic (vezi „Glicoliza" în condiţii anaerobe) şi $NADH + H^+$ produs în citoplasmă se reoxidează prin introducerea echivalenţilor de reducere în lanţul respirator. Cum însă membrana mitocondrială nu este permeabilă pentru coenzimele nicotinamidice, procesul are loc pe căi indirecte numite navete (shuttle).

Naveta „glicerolfosfat" (Fig. VI.13.A) operează astfel: $NADH + H^+$ format în diverse reacţii de reducere din citoplasmă se asociază cu apoenzima specifică formând glicerol-fosfatdehidrogenaza, enzimă ce catalizează reacţia de hidrogenare a dihidroxi-acetofosfatului (DHAP, intermediar glicolitic) la glicerolfosfat; întrucât membrana externă mitocondrială este permeabilă pentru glicerolfosfat, acesta pătrunde cu uşurinţă în spaţiul intermembranar. Pe suprafaţa externă a membranei interne mitocondriale este localizată glicerolfosfatdehidrogenaza mitocondrială care reoxidează glicerol-fosfatul la dihidroxiacetonfosfat, cei doi atomi de hidrogen fiind preluaţi de coenzima acestei enzime, care este de tip FP (FAD); de aici echivalenţii de reducere trec în lanţul respirator. Dihidroxiacetonfosfatul revine în citoplasmă şi suita de reacţii se reia.

Acţiunea navetei glicerol-fosfat este restrânsă la introducerea echivalenţilor de reducere de pe $NADH + H^+$ citoplasmatic în lanţul respirator. Ea este deci unidirecţională şi are ca scopuri menţinerea concentraţiei necesare de NAD^+ în citoplasmă şi furnizarea de echivalenţi de reducere lanţului respirator.

Printr-un mecanism mai complicat operează naveta „malat-aspartat" (Fig. VI.13.B); la transferul în sensul citoplasmă ---→ mitocondrie sau mitocondrie ---→ citoplasmă (naveta este deci bidirecţională) a echivalenţilor de reducere concură malatdehidrogenazele (MDH) şi glumatic-oxalocetic-transminazele (GOT) citoplasmatice şi mitocondriale precum şi transportori specializaţi pentru transferul prin membrana internă mitocondrială a malatului, glutamatului, aspartatului şi α-cetoglutaratului (notaţi pe figură, în ordine 1, 2, 3 şi 4). Prin acţiunea acestei navete se asigură atât reoxidarea $NADH + H^+$ citoplasmatic, cât şi, pe plan mai general, reglarea cuplurilor $NADH$ - NAD^+ extra şi intramitocondriale.

Alte navete sunt capabile să realizeze schimb de echivalenţi de reducere cu participarea şi a coenzimelor de tip NADP. Una dintre ele este responsabilă de formarea în citoplasmă a unor mari cantităţi de $NADPH + H^+$ necesar pentru biosinteze, în special de lipide.

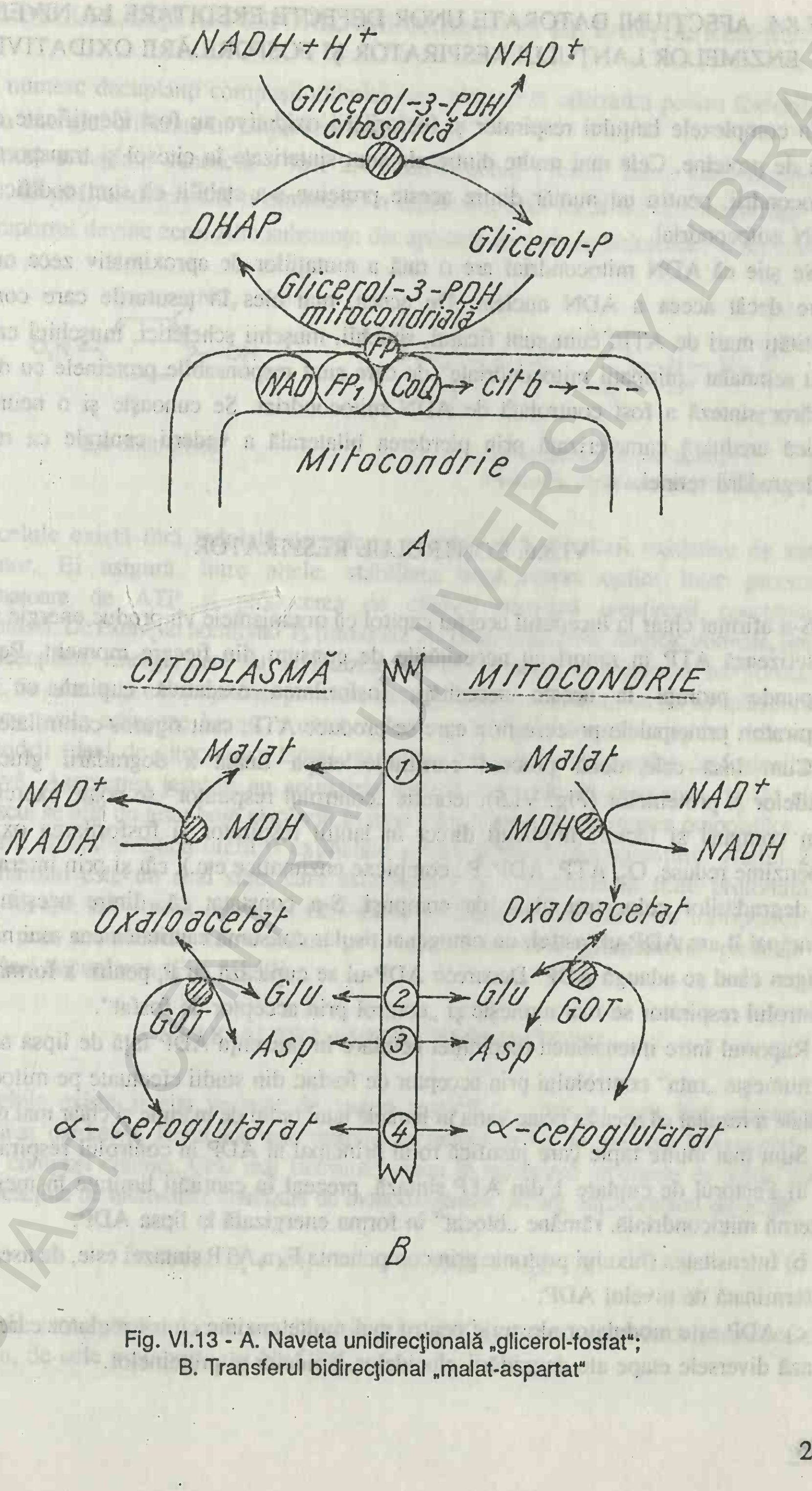


Fig. VI.13 - A. Naveta unidirecţională „glicerol-fosfat";
B. Transferul bidirecţional „malat-aspartat"

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI.8.5. AFECŢIUNI DATORATE UNOR DEFECTE EREDITARE LA NIVELUL ENZIMELOR LANŢULUI RESPIRATOR ŞI FOSFORILĂRII OXIDATIVE

În complexele lanţului respirator şi fosforilării oxidative au fost identificate câteva zeci de proteine. Cele mai multe dintre ele sunt sintetizate în citosol şi transportate în mitocondrii; pentru un număr dintre aceste proteine s-a stabilit că sunt codificate de ADN mitocondrial.

Se ştie că ADN mitocondrial are o rată a mutaţiilor de aproximativ zece ori mai mare decât aceea a ADN nuclear. De aceea, mai ales în ţesuturile care consumă cantităţi mari de ATP, cum sunt ficatul, rinichii, muşchii scheletici, muşchiul cardiac, s-au semnalat „miopatii mitocondriale" de care sunt responsabile proteinele cu defecte a căror sinteză a fost controlată de ADN mitocondrial. Se cunoaşte şi o neuropatie optică ereditară caracterizată prin pierderea bilaterală a vederii centrale ca rezultat al degradării retinei.

VI.8.6. CONTROLUL RESPIRATOR

S-a afirmat chiar la începutul acestui capitol că organismele vii produc energie şi deci sintetizează ATP în raport cu necesităţile de consum din fiecare moment. Pentru a răspunde prompt la aceste necesităţi, fosforilarea oxidativă cuplată cu lanţul respirator, principalele procese prin care se produce ATP, sunt riguros controlate.

Cum însă cele două procese constituie etapa finală a degradării glucidelor, lipidelor şi proteinelor (Fig. VI.5), teoretic „controlul respirator" se poate exercita atât prin compuşi şi factori implicaţi direct în lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă (coenzime reduse, O_2, ATP, ADP, P_i, complexe enzimatice etc.), cât şi prin intermediari ai degradărilor celor trei clase de compuşi. S-a constatat că, dintre aceştia, rolul principal îl are ADP-ul; astfel, un omogenat tisular consumă cantitatea cea mai mare de oxigen când se adaugă ADP. Deoarece ADP-ul se cuplează cu P_i pentru a forma ATP, controlul respirator se mai numeşte şi „control prin acceptor de fosfat".

Raportul între intensitatea respiraţiei celulare în prezenţa ADP faţă de lipsa acestuia se numeşte „rata" controlului prin acceptor de fosfat; din studii efectuate pe mitocondrii izolate a rezultat că aceasta poate varia în limitele unui ordin de mărime şi chiar mai mult.

Sunt mai multe fapte care justifică rolul principal al ADP în controlul respirator:

a) Factorul de cuplare 1 din ATP sintază, prezent în cantităţi limitate în membrana internă mitocondrială, rămâne „blocat" în forma energizată în lipsa ADP;

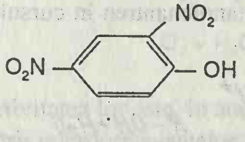
b) Intensitatea fluxului protonic prin componenta F_0 a ATP sintazei este, de asemenea, determinată de nivelul ADP;

c) ADP este modulator alosteric pentru mai multe enzime cu rol reglator care catalizează diversele etape ale degradării glucidelor, lipidelor şi proteinelor.

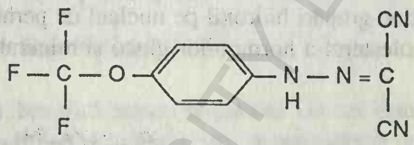
VI.8.7. DECUPLANŢI AI FOSFORILĂRII OXIDATIVE DE LANŢUL RESPIRATOR

Se numesc decuplanţi compuşii chimici care blochează utilizarea pentru fosforilarea ADP a energiei eliberate în lanţul respirator.

Primul decuplant cunoscut a fost 2,4-dinitrofenolul. Prezent într-o concentraţie de numai 10 μM, el determină o diminuare a raportului P/O cu 50%; la concentraţii mai mari raportul devine zero. Alte substanţe decuplatnte sunt unele hidrazone, izotiocianaţi:



2,4-dinitrofenol



carbonilcianidă-p-trifluoro-metoxifenilhidrazonă (FCCP)

În celule există fără îndoială decuplanţi naturali ai fosforilării oxidative de lanţul respirator. Ei asigură, între altele, stabilirea unui raport optim între procesele consumatoare de ATP şi producerea de căldură necesară menţinerii constante a temperaturii. De exemplu hormonul T_4 (tiroxina), în concentraţii peste limitele normale, are un efect decuplant. Energia care nu se utilizează în alte scopuri se disipează sub formă de căldură. Se admite şi existenţa unei proteine, termogenina (sau leptina), cu rol asemănător.

În ţesuturile adipoase brune, a căror culoare este datorată unui conţinut ridicat de mitocondrii (deci de citocromi), lanţul respirator funcţionează decuplat de fosforilarea oxidativă. Asemenea ţesuturi au animalele care hibernează; de asemenea, la făt şi la nou născut se află un ţesut brun răspândit în jurul vaselor mari şi în regiunea omoplaţilor.

Teoria chemiosmotică oferă o explicaţie pentru acţiunea decuplanţilor. Astfel 2,4-dinitrofenolul este un acid slab, care este solubil în membrană în stare protonată şi solubil în apă sub formă de anion (2,4-dinitrofenolat). El este deci un transportor de protoni prin membrană, determinând prin aceasta abolirea gradientului protonic şi provocând decuplarea (Fig. VI.12).

VI.8.8. ALTE LANŢURI RESPIRATORII

În celule există şi alte variante de lanţuri respiratorii, care nu sunt însă cuplate cu fosforilarea oxidativă. Rolul lor este restrâns la reducerea O_2 în vederea încorporării în anumiţi compuşi chimici. Cele mai frecvente cazuri le reprezintă procesele de hidroxilare. Astfel, reacţiile de hidroxilare catalizate de monooxigenaze decurg după schema generală:

$$R\text{-}H + O_2 + XH_2 \longrightarrow R\text{-}OH + H_2O + X$$

unde R-H este substratul care se hidroxilează iar XH_2 coenzima redusă donatoare de hidrogen, de cele mai multe ori NADPH.

În sistemul de hidroxilare localizat în reticulul endoplasmic al celulelor hepatice şi suprarenale, rol esenţial are Cit P_{450} ale cărui însuşiri sunt asemănătoare cu ale citocromoxidazei din mitocondrii. El cuprinde şi o flavoproteină (FAD) la nivelul căreia hidrogenul este disproporţionat în H^+ şi e^-. Simplificat, acţiunea acestui sistem de hidroxilare este redată în Fig. VI.14.

În ficat, acest sistem asigură hidroxilarea unor compuşi de origine exogenă (de exemplu medicamente) dar şi a unor compuşi endogeni (unii hormoni), care, devenind solubili, se elimină uşor din organism. În medulara suprarenalei, acelaşi sistem participă la sinteza noradrenalinei şi adrenalinei, în timp ce în corticosuprarenală se introduc grupări hidroxil pe nucleul de perhidrociclopentanofenantren în cursul sintezei din colesterol a hormonilor gluco şi mineralcorticoizi.

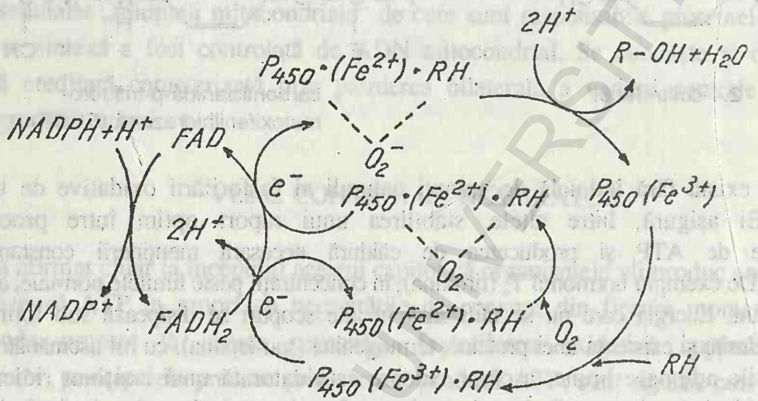


Fig. VI.14 - Lanţul respirator cu rol de hidroxizare din reticulul endoplasmic al celulelor hepatice şi renale

VI.8.9. SPECII INCOMPLET REDUSE ALE OXIGENULUI

În lanţul respirator nefosforilant din reticulul endoplasmic prezentat în Fig. VI.14, alături de oxigenul complet redus (O^{2-}) care intră în R-OH şi H_2O apare şi o specie de oxigen parţial redus, O_2^-, care se numeşte ion superoxid. Mici cantităţi de O_2^- se formează în cursul oxidării ferohemului din Hb la ferihem. Sisteme generatoare de radicali superoxid se află şi în membrana plasmatică, în peroxizomi cât şi în citosol. O reacţie care face parte din catabolismul purinelor, oxidarea xantinei la acid uric, generează permanent însemnate cantităţi din acest ion:

$$\text{Xantină} + 2O_2 + H_2O \xrightarrow[\text{oxidază}]{\text{Xantin}} \text{Acid uric} + 2O_2^- + 2H^+$$

Lanţul respirator mitocondrial este considerat de unii, în virtutea faptului că reducerea O_2 la $2O^{2-}$ se face în trepte, o importantă sursă de O_2^- ; s-a arătat, însă, recent, că

citocromoxidaza realizează nu numai reducerea dar şi fixarea fermă a O_2 şi tuturor formelor reduse ale acestuia, ea eliberând doar produsul cuplării O^{2-} cu ionii de H^+, adică apa.

Specii reactive ale oxigenului se generează în cursul iradierilor masive cu raze X şi γ. Anionul superoxid, cu caracter de radical, are o foarte mare reactivitate, putând interacţiona cu proteinele, acizii nucleici, lipidele etc.

Pe de altă parte, anionul superoxid generează alţi radicali liberi şi molecule care au, de asemenea, o mare reactivitate. Imporatanţă au mai ales radicalul hidroxil şi apa oxigenată:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}} O_2 + HO^- + HO\cdot$$

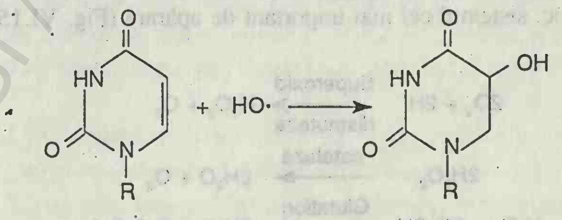
Reactivitatea lor este, în anumite situaţii, benefică pentru organism. Un caz este cel al fagocitării microorganismelor, particulelor străine şi fragmentelor de membrană de către neutrofile şi macrofage. Pentru omorârea bacteriilor, aceste celule acţionează printr-un mecanism oxigeno-dependent şi prin unul oxigeno-independent.

Mecanismul oxigeno-dependent include sistemul mieloperoxidază şi un altul care generează radicali ai oxigenului. În linii mari, acest mecanism operează astfel: după ce s-a produs fagocitoza, NADPH oxidaza, localizată în membrana leucocitelor, transformă O_2 din vecinătăţi în O_2^-; procesul este atât de rapid încât i s-a atribuit denumirea de „explozie respiratorie“ (respiratory burst). Mai departe, O_2^- este transformat în H_2O_2 prin reacţia de mai sus, care, în condiţiile catalizării de către superoxiddismutază, este foarte rapidă. În prezenţa mieloperoxidazei, o enzimă lizozomală, H_2O_2 şi Cl^- generează acid hipocloros (HOCl) care omoară bacteriile.

Mecanismul oxigeno-independent de distrugere a bacteriilor funcţionează pe principiul hidrolizei prin enzimele lizozomale cuplat cu variaţii însemnate de pH.

În cantităţile produse în mod curent, efectele distructive ale speciilor reactive ale oxigenului sunt nesemnificative deoarece organismul dispune de sisteme de apărare deosebit de eficace. Dacă, însă, limitele producerii normale a lor sunt depăşite, interacţia cu acizii nucleici, proteinele, lipidele şi alţi compuşi se produce, efectele fiind multiple: mutaţii, inactivitatea multor enzime, modificarea ciclului celular şi altele. Nu este surprinzător, de aceea, că un rol major în producerea sau în complicaţiile unor procese cum sunt îmbătrânirea, inflamaţiile, ischemiile, diabetul, malignizarea, îl au speciile reactive ale O_2. Două dintre interacţiunile acestor specii cu diverşi compuşi se dau în continuare:

1) Reacţia HO· cu bazele azotate din acizii nucleici:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

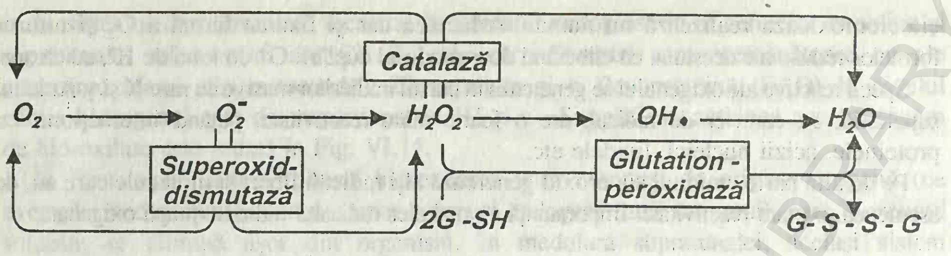
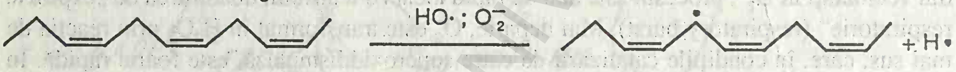


Fig. VI.15 - Sistemul enzimatic de apărare împotriva speciilor reactive ale oxigenului

Radicalul format suferă, la rândul lui, o serie de reacţii cu desfăşurare imprevizibilă. Severitatea afectării ADN este mare dacă se produc asemenea leziuni pe ambele lanţuri ale moleculei deoarece sistemele reparatorii nu mai pot reconstitui macromolecula iniţială.

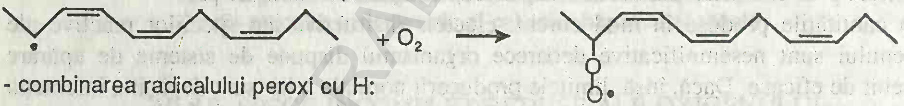
2) Peroxidarea lipidelor la nivelul acizilor graşi polinesaturaţi; este iniţiată de mai mulţi radicali între care şi O_2^- sau $HO\cdot$. Se produc în serie:

- atacul radicalic cu extragerea $H^\bullet$:

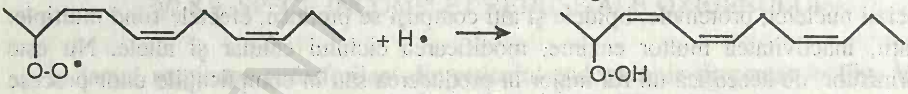


- rearanjarea moleculară:

- incorporarea oxigenului:



- combinarea radicalului peroxi cu H:



Sistemele de apărare ale organismului împotriva acestor efecte sunt de două tipuri:

a) enzimatic, prin care compuşii agresivi sunt transformaţi în compuşi inactivi; enzimele superoxiddismutază, catalază şi glutationperoxidază, care catalizează reacţiile de mai jos, sunt, la un loc, sistemul cel mai important de apărare (Fig. VI.15):

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow[\text{dismutaza}]{\text{Superoxid}} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2G\text{-}SH \xrightarrow[\text{peroxidază}]{\text{Glutation}} 2H_2O + G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acţiunea glutationperoxidazei este cuplată cu aceea a glutationreductazei, cu coenzimă NADPH + H^+, care reface glutationul redus:

$$G - S - S - G + NADPH + H^+ \xrightarrow[\text{reductaza}]{\text{Glutation}} 2G{-}SH + NADP^+$$

b) neenzimatic, prin care sunt împiedicate procesele oxidative; o serie de vitamine, respectiv, C, E şi A, prin caracterul lor reducător, detoxifică celulele de intermediarii reactivi ai oxigenului. Aceasta ar putea fi o explicaţie la constatările făcute în timp că prezenţa vitaminelor respective în cantităţi mari în hrană este corelată cu un risc mai redus de producere a unor tipuri de cancer şi cu o frecvenţă mai scăzută a altor afecţiuni.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. VII. METABOLISMUL GLUCIDELOR

VII.1. CHIMIA GLUCIDELOR

Glucidele sau zaharurile sunt compuşi polihidroxicarbonilici şi derivaţi ai acestora. Numele de hidraţi de carbon, care se mai foloseşte încă, sugerează că formulele empirice ale acestora conţin C, H, O în raport de 1/2/1. Deşi multe zaharuri se conformează formulei empirice $(CH_2O)_n$, denumirea s-a dovedit improprie pentru un număr mare de compuşi din această clasă care conţin alt raport al atomilor de C, H, O sau conţin în plus azot, sulf, fosfor.

Glucidele se împart în oze şi ozide, după comportarea la hidroliză.

Ozele, sau monozaharidele, sau zaharurile simple, conţin o singură unitate polihidroxicarbonilică (sunt deci nehidrolizabile). După natura grupării carbonil din moleculă, se împart în aldoze şi cetoze, iar după numărul atomilor de carbon se împart în trioze, tetroze, pentoze, hexoze, heptoze, octoze:

CHO – $(CHOH)_n$ – CH_2OH (n = 1 - 6)

CH_2OH – C = O – $(CHOH)_n$ – CH_2OH (n = 0 - 5)

Cele mai importante şi abundente sunt hexozele (glucoză, fructoză, galactoză) şi pentozele (riboză).

Ozidele se împart, după numărul de unităţi monozaharidice la care dau naştere prin hidroliză, în oligozide şi poliozide.

Oligozidele sau oligozaharidele sunt constituite dintr-un număr relativ mic de unităţi monozaharidice (între două şi zece) legate covalent. Dintre oligozaharidele care se găsesc în ţesuturile animale şi vegetale, ca atare, cele mai frecvente sunt: zaharoza, lactoza, maltoza. Oligozaharidele constituite din mai multe subunităţi monozaharidice nu se găsesc libere; ele formează lanţurile laterale ale unor catene polipeptidice din structura glicoproteinelor.

Polizaharidele conţin un număr mare de unităţi monozaharidice (de ordinul sutelor sau miilor), pe care le pot elibera prin hidroliză. Polizaharidele cele mai răspândite în regnul vegetal sunt amidonul şi celuloza, iar în regnul animal, glicogenul.

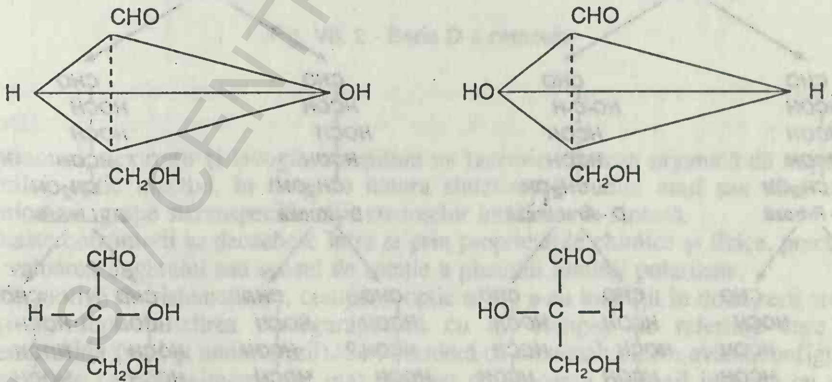
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.1.1. MONOZAHARIDELE

Stereoizomeria monozaharidelor

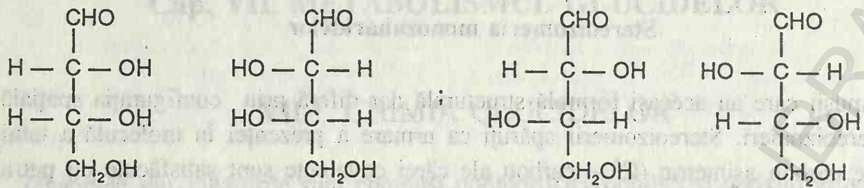
Compuşii care au aceeaşi formulă structurală dar diferă prin configuraţia spaţială sunt stereoizomeri. Stereoizomerii apăruţi ca urmare a prezenţei în moleculă a unui atom de carbon asimetric (C^* – carbon ale cărei covalenţe sunt satisfăcute cu patru substituenţi diferiţi) sunt stereoizomeri optic activi. Numărul de stereoizomeri posibili ai unui compus conţinând n carboni asimetrici este egal cu 2^n. Toate monohazaridele (cu excepţia cetotriozei, respectiv dihidroxiacetona) conţin în moleculă atomi de carbon asimetrici, fiind optic active. Prezenţa unui C^* într-o moleculă face ca aceasta să poată exista în două configuraţii diferite, nesuperpozabile, comportându-se una faţă de alta ca obiectul şi imaginea sa în oglindă, ca mâna dreaptă faţă de cea stângă. Moleculele ozelor sunt deci molecule chirale (chiros = mână) având ca centru chiralic, de asimetrie, unul sau mai mulţi atomi de carbon asimetrici.

Cea mai simplă aldoză, aldotrioza (gliceraldehida), având un singur carbon asimetric, se prezintă sub forma a doi stereoizomeri optic activi care se deosebesc între ei exclusiv prin sensul în care rotesc planul luminii polarizate (au aceleaşi proprietăţi fizice şi chimice). Aceşti doi stereoizomeri optic activi poartă numele de enantiomeri şi se găsesc unul faţă de celălalt ca obiectul faţă de imaginea sa în oglindă. Prin convenţie, cei doi stereoizomeri ai gliceraldehidei au fost desemnaţi D şi L. Configuraţia absolută a celor patru substituienţi ai carbonului asimetric, stabilită prin studii de difracţie a razelor X, este redată prin formulele de perspectivă şi plane:



D - gliceraldehida L - gliceraldehida

Aldotetrozele, conţinând două centre de chiralitate (doi atomi de carbon asimetrici), se prezintă sub forma a 2^2 (patru) stereoizomeri optic activi care formează două perechi de enantiomeri (I şi II):



I II

Aldopentozele conţin trei atomi de carbon asimetrici şi deci se prezintă sub forma a 2^3 (opt) stereoizomeri optic activi grupaţi în patru perechi de enantiomeri. Similar, există 16 aldohexoze stereoizomere grupate în opt perechi de enantiomeri.

Aşa cum s-a mai arătat, stereoizomerii care diferă între ei prin configuraţia tuturor atomilor de carbon asimetrici sunt enantiomeri, în timp ce aceia care diferă prin configuraţia a unu, maximum n - 1 carboni asimetrici (din totalul de n C^*), sunt diastereoizomeri. Diastereoizomerii care diferă prin configuraţia unui singur atom de carbon asimetric se numesc epimeri. Schimbarea configuraţiei unui C^* se numeşte epimerizare.

Enantiomerii se deosebesc între ei exclusiv prin sensul de rotaţie a planului luminii polarizate, unghiul de rotaţie fiind acelaşi. Amestecul echimolecular al celor doi

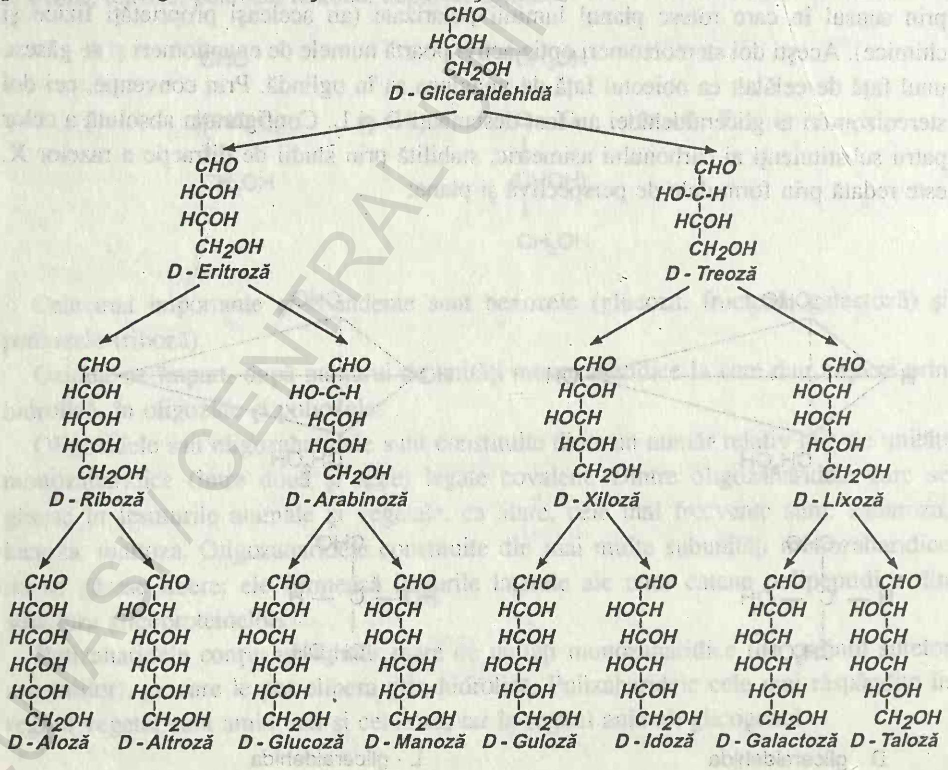


Fig. VII. 1 - Seria D a aldozelor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

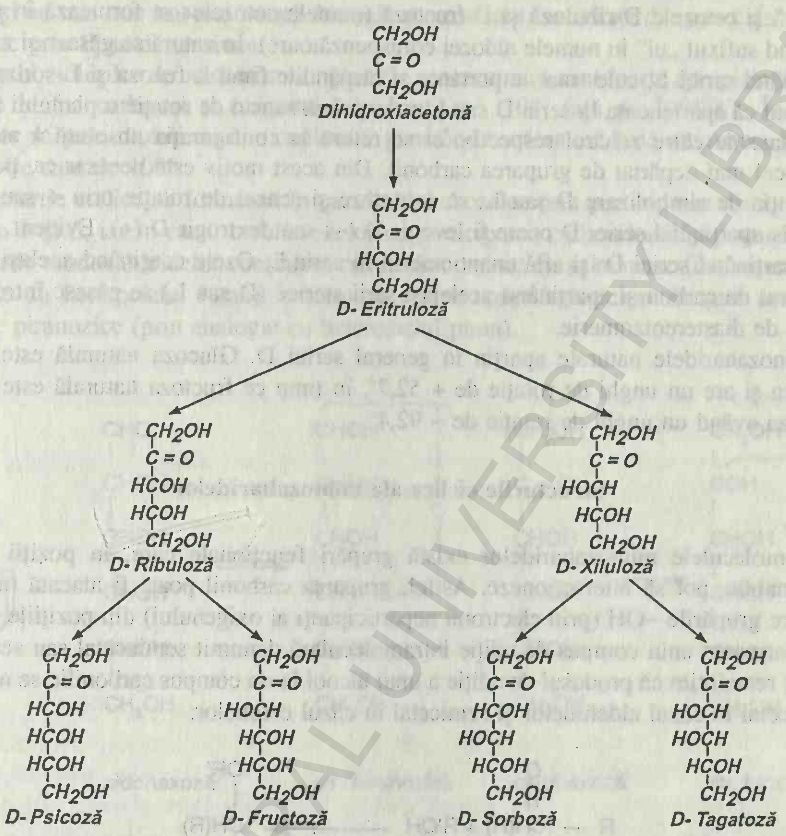


Fig. VII. 2 - Seria D a cetozelor

enantiomeri, dextrogir şi levogir, constituie un racemic. Sinteza organică dă naştere la racemici, optic inactivi, în timp ce natura sintetizează numai unul sau altul dintre enantiomeri, graţie stereospecificităţii enzimelor implicate în sinteză.

Diastereoizomerii se deosebesc între ei prin proprietăţile chimice şi fizice, precum şi prin valoarea unghiului sau sensul de rotaţie a planului luminii polarizate.

Din motive de sistematizare, compuşii optic activi s-au împărţit în două serii sterice, D şi L, după înrudirea configuraţională cu un compus de referinţă care este gliceraldehida (vezi şi aminoacizii). Se consideră că monozaharidele având configuraţia atomului de carbon asimetric cel mai depărtat de gruparea carbonil identică cu cea a carbonului asimetric din D-gliceraldehidă aparţin seriei sterice D, iar cele având configuraţia aceluiaşi atom de carbon identică cu cea a carbonului din L-gliceraldehidă aparţin seriei sterice L. În Fig. VII.1 şi Fig. VII.2 sunt redate structurile stereoizomerilor aldozelor şi cetozelor aparţinând seriilor D.

Nu toţi stereoizomerii posibili se găsesc în natură. Cele mai răspândite şi importante din punct de vedere biologic sunt aldozele D-riboză, D-glucoză, D-galactoză şi D-manoză şi cetozele D-ribuloză şi D-fructoză (numele cetozelor se formează în general inserând sufixul „ul" în numele aldozei corespunzătoare). În natură se găsesc şi zaharuri aparţinând seriei L, cele mai importante şi răspândite fiind L-fucoza şi L-sorboza. De subliniat că apartenenţa la seria D sau L nu exprimă sensul de rotaţie a planului luminii polarizate de către zahărul respectiv, ci se referă la configuraţia absolută a atomului de C^* cel mai depărtat de gruparea carbonil. Din acest motiv este necesar ca, pe lângă convenţia de simbolizare D sau L, să se noteze şi sensul de rotaţie prin + sau –. Un compus aparţinând seriei D poate fi levogir D (–) sau dextrogir D (+). Evident, fiecare oză aparţinând seriei D îşi află enantiomerul în seria L. Ozele conţinând acelaşi număr de atomi de carbon şi aparţinând aceleiaşi serii sterice (D sau L) se găsesc între ele în relaţie de diastereoizomerie.

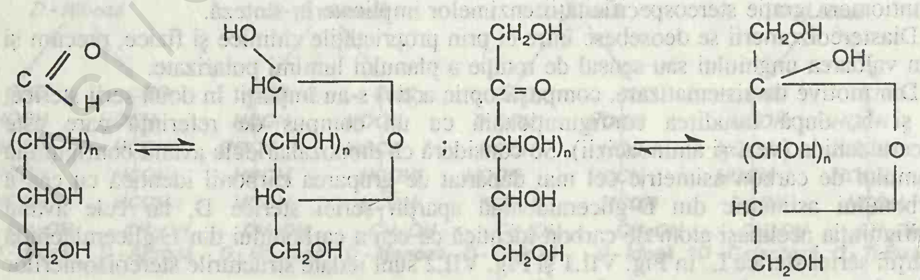
Monozaharidele naturale aparţin în general seriei D. Glucoza naturală este D (+) glucoza şi are un unghi de rotaţie de + 52,7°, în timp ce fructoza naturală este D (–), fructoza având un unghi de rotaţie de – 92,4°.

Structurile ciclice ale monozaharidelor

În moleculele monozaharidelor există grupări funcţionale care, în poziţii sterice convenabile, pot să interacţioneze. Astfel, gruparea carbonil poate fi atacată nucleofil de către grupările –OH (prin electronii neparticipanţi ai oxigenului) din poziţiile 4,5 sau 6 cu formarea unui compus de adiţie intramoleculară denumit semiacetal sau semicetal intern; reamintim că produsul de adiţie a unui alcool la un compus carbonilic se numeşte semiacetal în cazul aldehidelor şi semicetal în cazul cetonelor:

$$R - \overset{\overset{\large O}{||}}{CH(R)} + R'OH \longrightarrow \underset{\underset{\large OH}{|}}{\overset{\overset{\large OR'}{|}}{CH(R)}}$$

Gruparea hidroxil, apărută la fostul carbon carbonilic, poartă numele de hidroxil semiacetalic sau glicozidic şi se deosebeşte ca reactivitate de celelalte. Reacţiile de formare a semiacetalilor pentru aldoze şi cetoze pot fi schematizate:

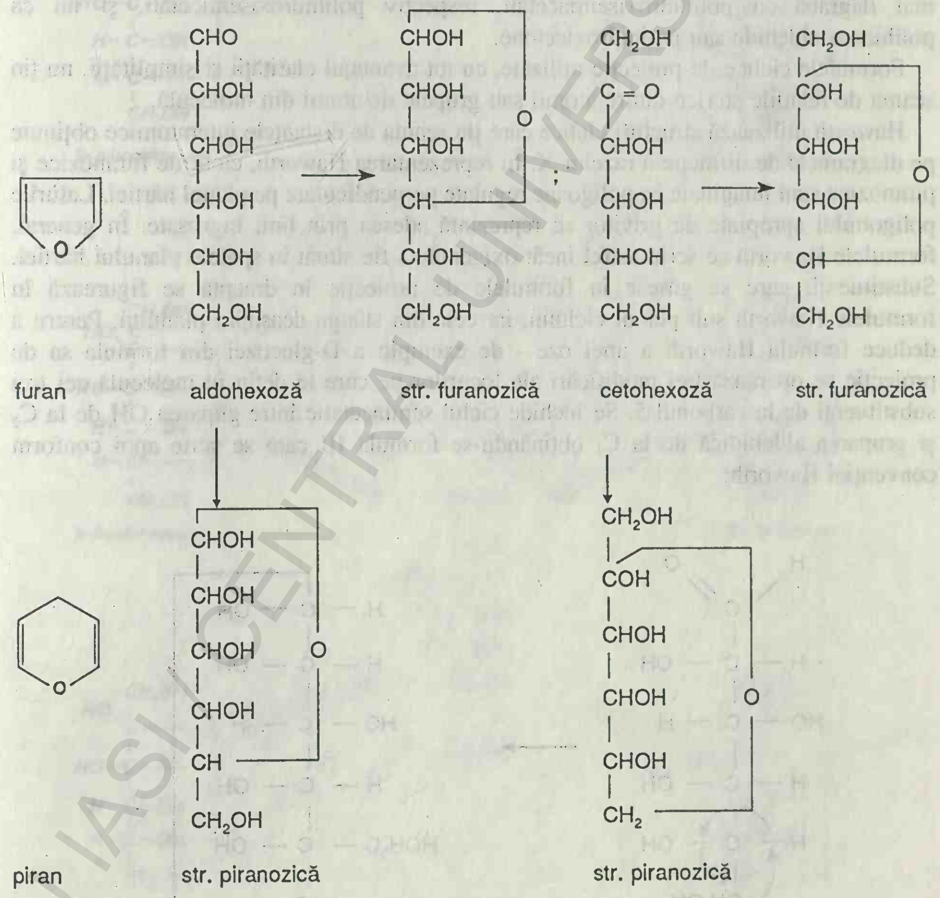


BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Semiacetalii interni se formează cu participarea unei grupări -OH situate într-o poziţie relativă faţă de carbonil care să permită formarea unui ciclu de cinci sau şase atomi (şi nu mai mic sau mai mare), întrucât acestea sunt favorizate din punct de vedere energetic prin lipsa de tensiune.

În cazul ciclurilor de cinci atomi unghiurile pentagonului sunt foarte apropiate de cele pe care le fac carbonul şi oxigenul hibridizaţi sp^3 (108° faţă de 109°28'). În cazul ciclurilor de şase, atomii nu sunt coplanari, generând conformeri, baie sau scaun, în care unghiurile sunt de 109°.

Structurile ciclice se formează în cazul aldohexozelor prin participarea carbonilor 1 şi 4 sau 1 şi 5, iar în cazul cetohexozelor cu participarea carbonilor 2 şi 5 sau 2 şi 6. Structurile monozaharidelor conţinând cicluri de cinci atomi se numesc furanozice (prin analogie cu heterociclul furan) în timp ce acelea conţinând cicluri de şase atomi se numesc piranozice (prin analogie cu heterociclul piran).



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structurile piranozice sunt mai stabile în soluție decât cele furanozice, care se întâlnesc, mai ales, în combinații ale ozelor.

Ca urmare a reacției de ciclizare prin semiacetalizare, fostul carbon carbonilic devine carbon asimetric putând să adopte două configurații sterice diferite. Apar doi stereoizomeri supranumerari numiți anomeri, în care atomul de carbon care leagă gruparea -OH semiacetalică poate avea două configurații diferite (anomer α și β). Anomerii α se figurează în formulele ciclice de proiecție cu gruparea -OH semiacetalică de aceiași parte a catenei de carbon ca și oxigenul din ciclu, spre deosebire de anomerii β.

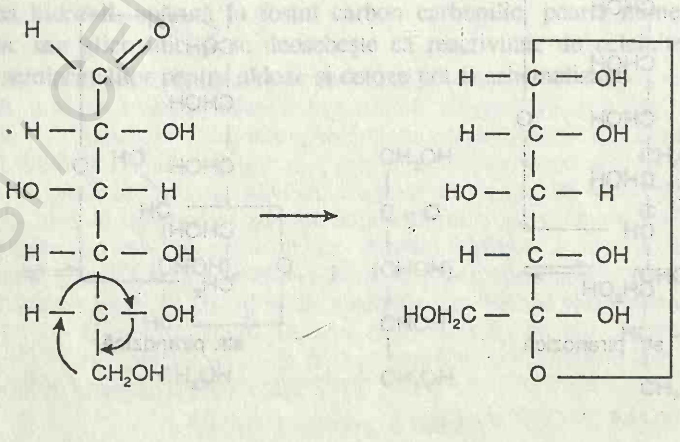
Cele două forme anomere pot trece una în cealaltă prin intermediul formei aciclice care, în soluție apoasă, este prezentă în cantități minime. Formele piranozice și furanozice (α și β) ale glucozei (a) și fructozei (b) sunt reprezentate în Fig. VII 3.

De menționat că cei doi anomeri diferă între ei prin proprietățile chimice și fizice ca și prin valoarea unghiului de rotație.

Toate considerațiile de mai sus cu privire la structura ozelor îndreptățesc definirea lor mai degrabă ca polihidroxisemiacetali, respectiv polihidroxisemicetali, și nu ca polihidroxialdehide sau polihidroxicetone.

Formulele ciclice de proiecție utilizate, cu tot avantajul clarității și simplității, nu țin seama de relațiile sterice dintre atomii sau grupele de atomi din moleculă.

Haworth utilizează structuri ciclice care țin seama de distanțele interatomice obținute pe diagramele de difracție a razelor X. În reprezentarea Haworth, ciclurile furanozice și piranozice sunt imaginate ca poligoane regulate perpendiculare pe planul hârtiei. Laturile poligonului apropiate de privitor se reprezintă adesea prin linii îngroșate. În general, formulele Haworth se scriu astfel încât oxigenul să fie situat în spatele planului hârtiei. Substituenții care se găsesc în formulele de proiecție în dreapta se figurează în formulele Haworth sub planul ciclului, iar cele din stânga deasupra planului. Pentru a deduce formula Haworth a unei oze - de exemplu a D-glucozei din formula sa de proiecție se operează trei modificări ale locurilor pe care le dețin în moleculă cei trei substituenți de la carbonul 5. Se închide ciclul semiacetalic între guparea OH de la C_5 și gruparea aldehidică de la C_1 obținându-se formula III care se scrie apoi conform convenției Haworth:



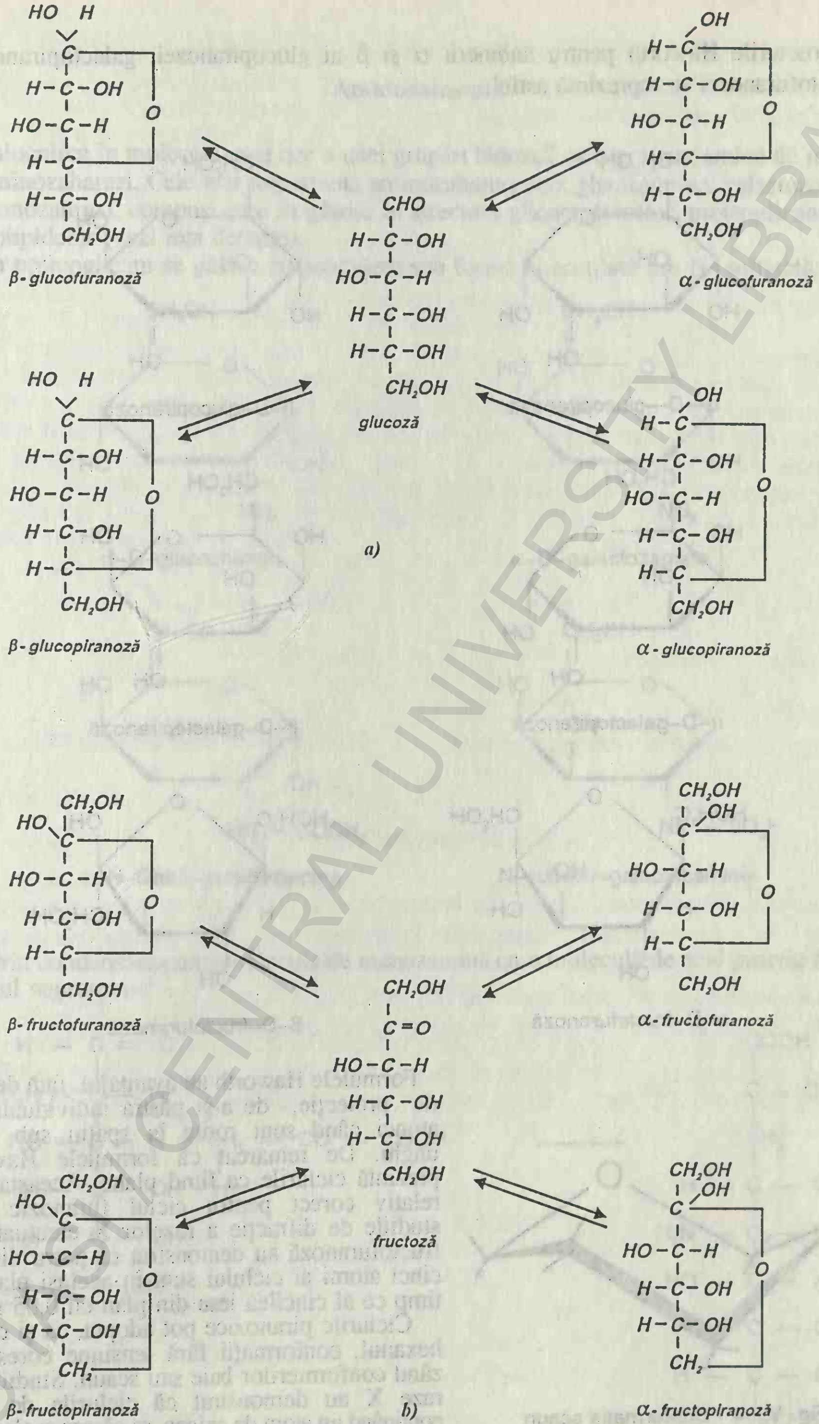
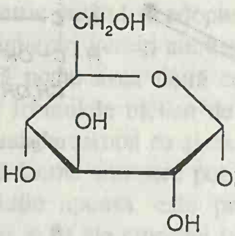


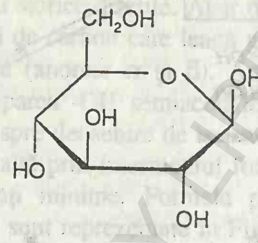
Fig. VII. 3 - Structurile ciclice ale glucozei (a) şi fructozei (b)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

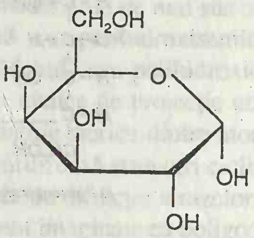
Structurile Haworth pentru anomerii α şi β ai glucopiranozei, galactopiranozei şi fructofuranozei se reprezintă astfel:



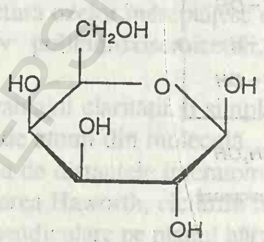
α—D—glucopiranoză



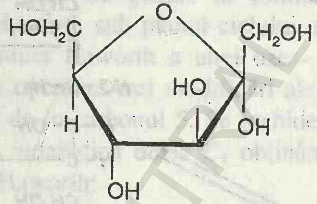
β–D–glucopiranoză



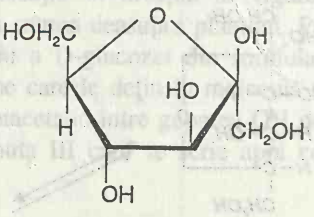
α–D–galactopiranoză



β–D–galactopiranoză



α–D–fructofuranoză



β–D–fructofuranoză

Formulele Haworth au avantajul, faţă de cele de proiecţie, de a-şi păstra individualitatea atunci când sunt rotite în spaţiu sub orice unghi. De remarcat că formulele Haworth prezintă ciclurile ca fiind plane. Aceasta este relativ corect pentru ciclul furanozic deşi studiile de difracţie a razelor X efectuate pe fructofuranoză au demonstrat că patru din cei cinci atomi ai ciclului sunt în acelaşi plan, în timp ce al cincilea iese din plan cu 0,05 nm.

Ciclurile piranozice pot adopta, ca şi ciclohexanul, conformaţii fără tensiune corespunzând conformerilor baie sau scaun. Studiile cu raze X au demonstrat că ciclurile de şase, conţinând un atom de oxigen, se găsesc exclusiv în conformaţie scaun (Fig. VII.4).

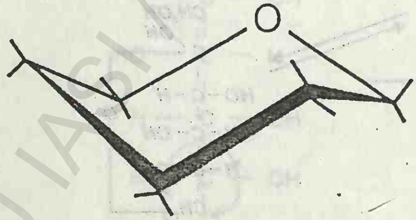


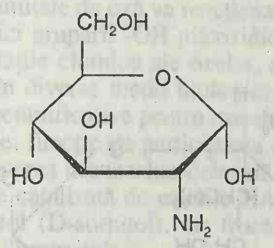
Fig. VII. 4 - Conformaţia scaun a unei piranoze

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

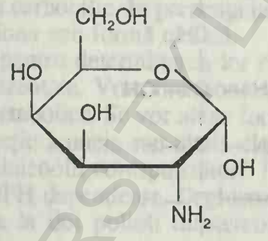
Aminozaharuri

Înlocuirea în molecula unei oze a unei grupări hidroxil cu o grupare amino dă naştere la aminozaharuri. Cele mai importante aminozaharuri sunt glucozamina, galactozamina, şi manozamina, compuşi care se găsesc în structura glicoproteinelor, proteoglicanilor şi glicolipidelor (vezi mai departe).

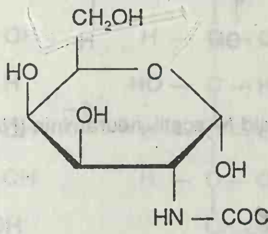
În proteoglicani se găsesc cu precădere sub formă N-acetilată sau N- sulfatată:



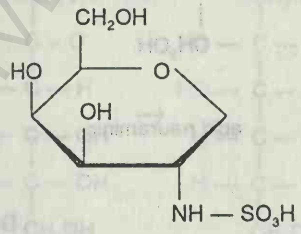
α–D–glucozamina



α–D–galactozamina

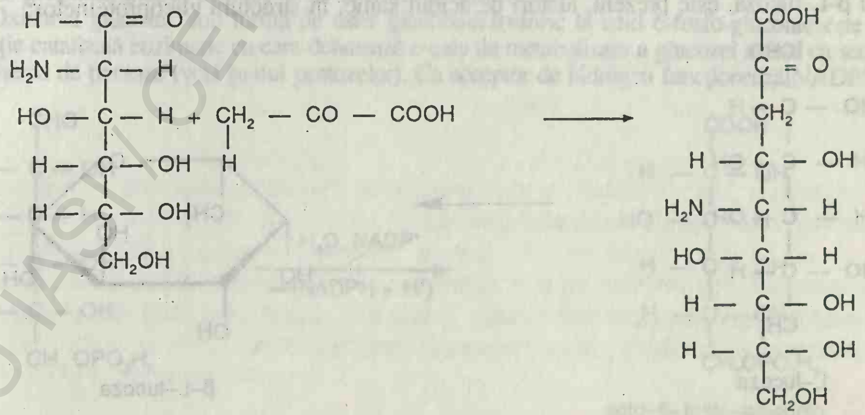


α–N–acetil–galactozamina



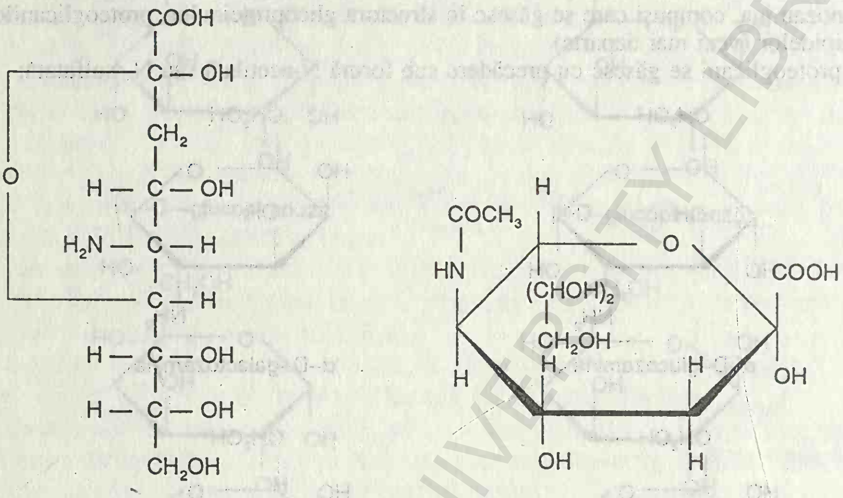
N–sulfatul–galactozaminei

Prin condensarea unei molecule de manozamină cu o moleculă de acid piruvic rezultă acidul neuraminic:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acilarea acidului neuraminic dă naştere la N-acilderivaţi denumiţi acizi sialici. Dacă restul acil este un rest acetil rezultă acidul N-acetil neuraminic (NANA), constituent principal al glicoproteinelor:

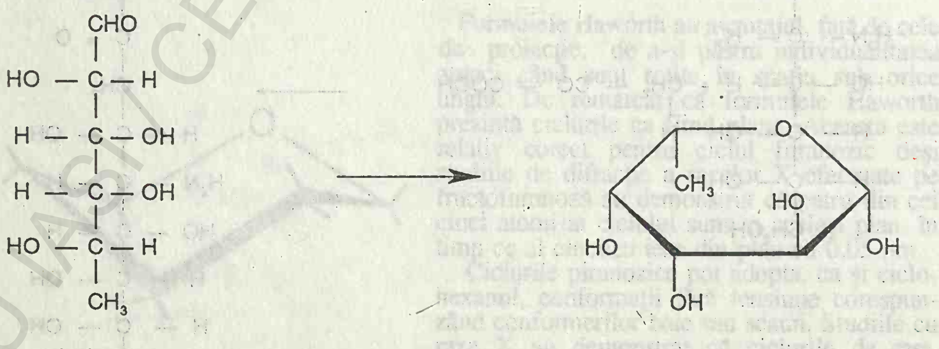


acid neuraminic   acid N-acetil-neuraminic (NANA)

Dezoxizaharuri

Înlocuirea unei grupări hidroxil din molecula unei oze cu un atom de hidrogen dă naştere la dezoxizaharuri. Un dezoxizahar important este 2-dezoxiriboza, componenta glucidică din structura acizilor dezoxiribonucleici (vezi acizii nucleici).

Un alt dezoxizahar important, provenit din galactoză, şi anume 6-dezoxi-β-L-galactoză sau β-L-fucoza, este prezent, alături de acidul sialic, în structura glicoproteinelor:



L-fucoza   β-L-fucoza

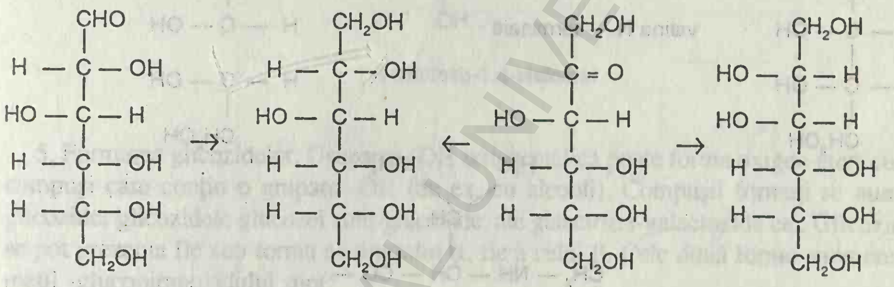
Monozaharidele sunt substanţe solide, cristalizate, solubile în solvenţi polari graţie numărului mare de grupări -OH din moleculă.

Prezenţa grupărilor funcţionale > C = O şi - OH în molecula ozelor le conferă o reactivitate chimică deosebită, exprimată în multitudinea de reacţii pe care le prezintă.

În soluţie, diversele forme ciclice coexistă cu forma aciclică, chiar dacă aceasta din urmă nu depăşeşte 0,02%. În prezenţa unui reactant specific grupării > C = O echilibrul se deplasează spre forma aciclică pe măsură ce aceasta se consumă în reacţie astfel încât întreaga cantitate de oză va reacţiona ca un compus carbonilic. În prezenţa unor reactanţi caracteristici grupării -OH glicozidic oza va reacţiona sub formă ciclică.

Proprietăţile chimice ale ozelor, având interes pentru determinarea lor cantitativă şi calitativă în diverse medii biologice, nu vor fi prezentate. Vom menţiona aici exclusiv pe acelea semnificative pentru transformările lor metabolice. Se vor alege formele ciclice sau aciclice, funcţie de participarea efectivă la reacţie a uneia sau alteia dintre ele.

1. Reducerea monozaharidelor dă naştere la polialcoolii corespunzători. În organism, reacţia este catalizată de enzime NADH sau NADPH dependente. D-glucoza se reduce la D-glucitol (D-sorbitol), iar fructoza dă naştere la doi polioli diastereoizomeri: D-sorbitol şi D-manitol:

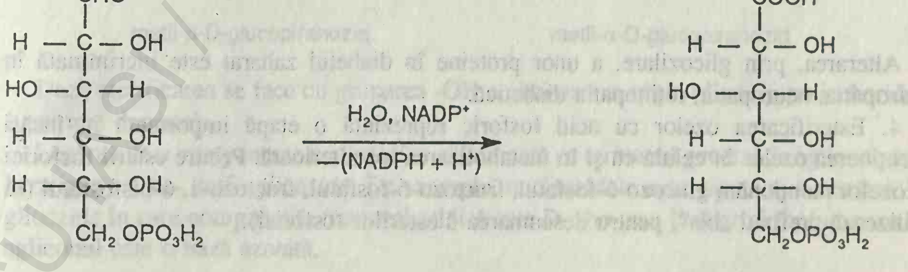


D-glucoză D-sorbitol D-fructoza D-manitol

În diabetul zaharat se formează mari cantităţi de sorbitol, prin excelenţă în retină, ceea ce contribuie la instalarea retinopatiei diabetice.

2. Oxidarea ozelor poate decurge fie la gruparea carbonil, când se obţin acizi aldonici, fie la gruparea alcool primar, când se obţin acizi uronici.

Oxidarea glucozei, sub formă de ester glucozo-6-fosforic la acid 6-fosfo-gluconic este o reacţie catalizată enzimatic cu care debutează o cale de metabolizare a glucozei având ca scop obţinerea de pentoze (vezi şuntul pentozelor). Ca acceptor de hidrogen funcţionează NADP⁺.



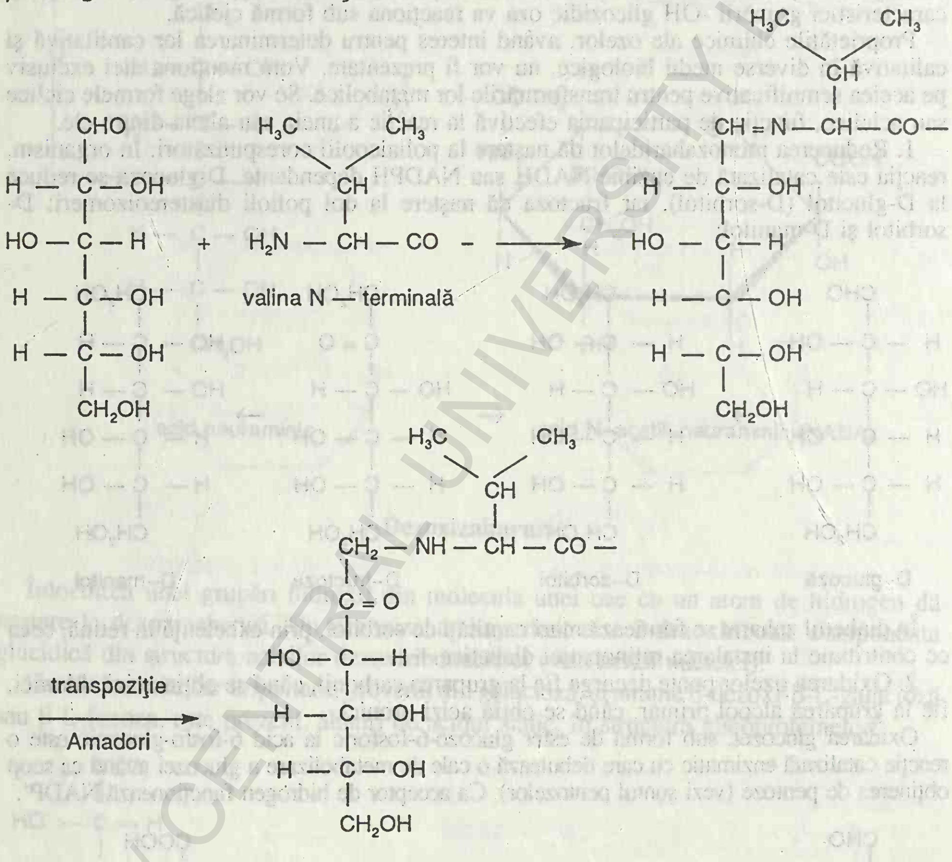
acid-6-fosfo-gluconic

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Oxidarea energică a grupării alcool primar duce la acid glucuronic şi reprezintă o reacţie importantă utilizată în procesele de detoxifiere sau în sinteza unor proteoglicani ce conţin în structura lor acid glucuronic (vezi calea acizilor uronici).

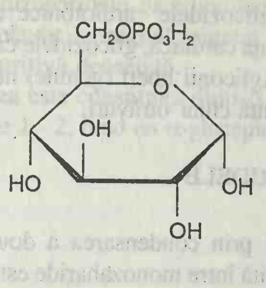
3. Condensarea cu compuşi conţinând grupări amino dă naştere la compuşi de tip bază Schiff. Interacţiunea glucozei cu grupările amino ale unor proteine este responsabilă de formarea în organism a proteinelor glicozilate. Gradul de glicozilare a unor proteine, cum ar fi hemoglobina, constituie un test de apreciere a cantităţii de glucoză din sânge.

Se consideră că în hemoglobină grupările amino ale valinei terminale de pe lanţurile β sunt glicozilate conform reacţiilor:

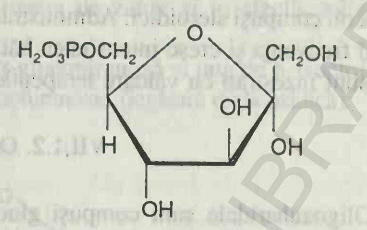


Alterarea, prin glicozilare, a unor proteine în diabetul zaharat este incriminată în nefropatia, neuropatia, retinopatia diabetică.

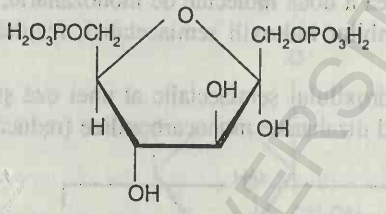
4. Esterificarea ozelor cu acid fosforic reprezintă o etapă importantă în însăşi menţinerea ozelor în celulă ca şi în metabolizarea lor ulterioară. Printre esterii fosforici ai ozelor menţionăm glucozo-6-fosfatul, fructozo-6-fosfatul, fructozo-1, 6-bisfosfatul (se utilizează prefixul „bis“, pentru desemnarea diesterilor fosforici).



α-glucozo-6-fosfat

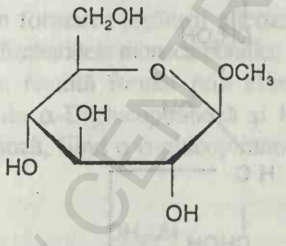


α-fructozo-6-fosfat

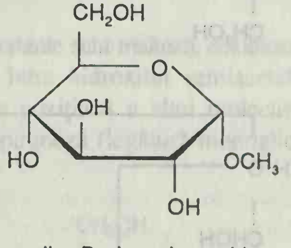


α-fructozo-1,6-bisfosfat

5. Formarea glicozidelor. Gruparea -OH semiacetalică poate forma oxigen-eteri cu alţi compuşi care conţin o grupare -OH (de ex. cu alcooli). Compuşii formaţi se numesc glicozide: glicozidele glucozei sunt glucozide, ale galactozei-galactozide etc. Glicozidele se pot prezenta fie sub forma anomerului α, fie a celui β. Cele două forme anomere ale metil -glucopiranozidului sunt:



metil-β-D-glucopiranozid



metil-α-D-glucopiranozid

Dacă eterificarea se face cu gruparea -OH a altei oze se obţin oligo- şi polizaharidele (vezi mai departe).

Legarea unei componente neglucidice, desemnată cu termenul general de aglicon, duce la oxigen-, azot-, sulf-, glicozide. De exemplu, nucleozidele sunt, aşa cum s-a arătat, N-glicozide în care componenta monozaharidică este D-ribo- sau D-dezoxiribofuranoza iar agliconul este o bază azotată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

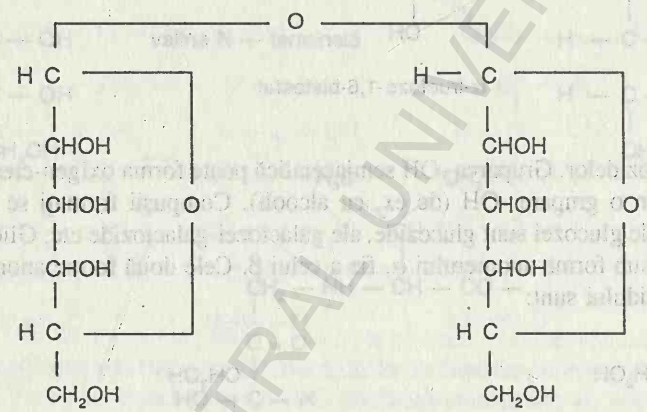
Importante din punct de vedere medical sunt glicozidele cardiotonice care au ca aglicon compuşi steroidici. Administrate în insuficienţa cardiacă, glicozidele cardiotonice scad frecvenţa şi cresc intensitatea bătăilor inimii. Agliconii liberi (genine) nu numai că nu sunt înzestraţi cu valoare terapeutică dar reprezintă chiar otrăvuri.

VII.1.2. OLIGOZAHARIDELE

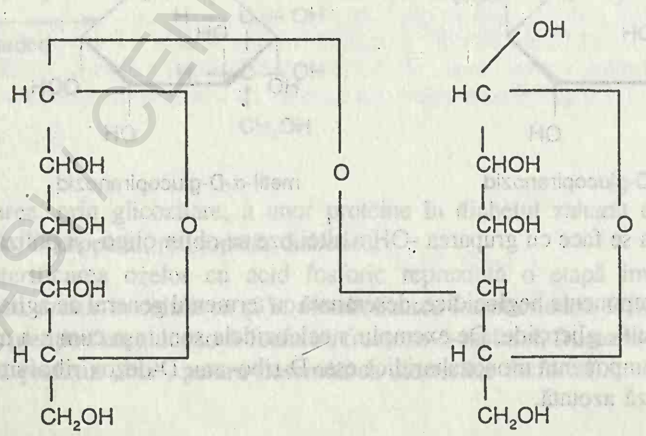
Oligozaharidele sunt compuşi glucidici rezultaţi prin condensarea a două sau mai multor monozaharide (maximum 10). Legătura stabilită între monozaharide este de natură glicozidică.

Cele mai importante şi abundente oligozaharide sunt dizaharidele. Dizaharidele rezultă, formal, prin condensarea a două molecule de monozaharid, care se poate face:

- cu participarea ambilor hidroxili semiacetalici, rezultând dizaharide dicarbonilice (nereducătoare);
- cu participarea hidroxilului semiacetalic al unei oze şi a unui hidroxil alcoolic al celeilalte oze, rezultând dizaharide monocarbonilice (reducătoare).



dizaharid dicarbonilic

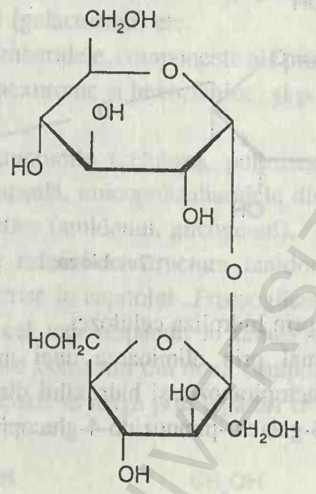


dizaharid monocarbonilic

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dintre dizaharidele dicarbonilice cel mai important este zaharoza (sucroza), glucid foarte răspândit în regnul vegetal şi anume în trestia de zahăr şi în sfeclă, având o valoare nutritivă deosebită.

Zaharoza este constituită dintr-o moleculă de α-glucopiranoză şi una de β-fructofuranoză, legate 1 - 2, fiind un α-glucopiranozido-β-fructofuranozid (legătură diglicozidică):



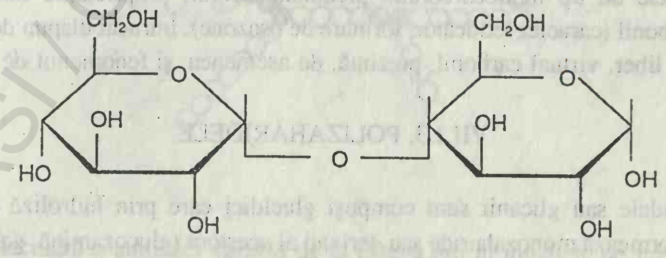
zaharoza

Prin hidroliză enzimatică, sub acţiunea zaharazei, denumită şi invertază, zaharoza, zahăr dextrogir ($[\alpha]_D^{20} = +66{,}5°$), formează un amestec echimolecular de fructoză levogiră ($[\alpha]_D^{20} = -92°$) şi glucoză dextrogiră ($[\alpha]_D^{20} = +52{,}5°$), care va roti planul luminii polarizate spre stânga. Acest proces de hidroliză a zaharozei poartă, din acest motiv, şi numele de invertire a zahărului.

Zaharoza nu prezintă proprietăţile ozelor conferite de gruparea semiacetalică, virtual carbonil (caracter reducător, formare de osazone, anomerie), întrucât ambele grupări sunt angajate în formarea legăturii glicozidice.

Dintre dizaharidele monocarbonilice cele mai importante sunt maltoza, celobioza şi lactoza.

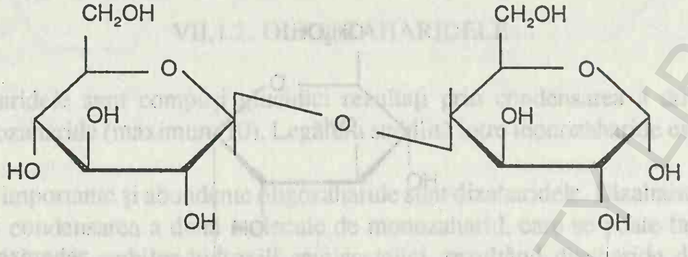
Maltoza rezultă formal prin eliminarea apei între hidroxilul semiacetalic al unei molecule de α-D-glucopiranoză şi hidroxilul din poziţia 4 a altei molecule de α-D-glucopiranoză, fiind o α-glucopiranozido-4-glucopiranoză (legătură monoglicozidică):



Maltoza

Maltoza ia naştere prin hidroliza enzimatică a amidonului şi glicogenului.

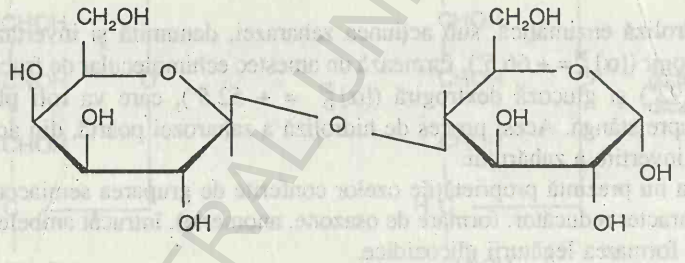
Celobioza este dizaharidul format din două molecule de β-glucopiranoză legate 1,4 fiind o β-glucopiranozido-4-glucopiranoză:



Celobioza

Celobioza ia naştere prin hidroliza celulozei.

Lactoza rezultă formal prin eliminarea unei molecule de apă între hidroxilul semiacetalic al β-D-galactopiranozei şi hidroxilul din poziţia 4 a unei molecule de β-glucopiranoză, fiind o β-galacto-piranozido-4-glucopiranoză:



Lactoza

Lactoza se găseşte în laptele mamiferelor care o sintetizează din glucoză. Sub acţiunea unei β-galactozidaze este hidrolizată la zaharurile componente.

Dizaharidele de tip monocarbonilic prezintă, desigur, proprietăţile ozelor date de gruparea carbonil (caracter reducător, formare de osazone). Întrucât dispun de un hidroxil semiacetalic liber, virtual carbonil, prezintă, de asemenea, şi fenomenul de anomerie.

VII.1.3. POLIZAHARIDELE

Polizaharidele sau glicanii sunt compuşi glucidici care prin hidroliză chimică sau enzimatică formează monozaharide sau derivaţi ai acestora (glucozamină, galactozamină, acizi uronici, acid N-acetil - neuraminic).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se disting:

– homoglicani – produşi de policondensare a unui singur tip de unitate structurală;

– heteroglicani – produşi de policondensare a mai multor tipuri de unităţi structurale.

Dintre homoglicani, polimerii de glucoză (glicani) sunt cei mai răspândiţi, fiind reprezentaţi de celuloză, glicogen, amidon. Se cunosc şi polimeri ai manozei (manani), arabinozei (arabinani), galactozei (galactozani) etc.

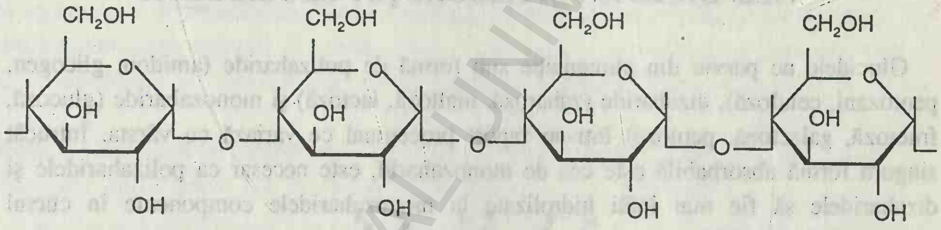
Dintre heteroglicani, mucopolizaharidele, componente ale proteoglicanilor (constituite, în general, din molecule de acid hexuronic şi hexozamine) şi poliozidele bacteriene sunt cele mai răspândite.

Glicanii îndeplinesc roluri structurale (celuloza, poliozidele prezente în peretele ectoplasmic al bacteriilor şi în capsulă, mucopolizaharidele din ţesutul conjunctiv) sau de depozitare a rezervelor energetice (amidonul, glicogenul).

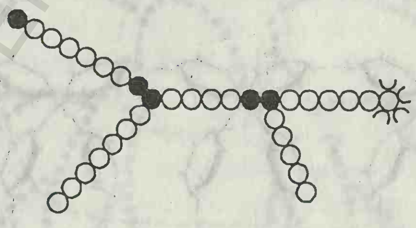
În acest capitol se vor face referiri la structura amidonului şi a glicogenului. Mucopolizaharidele vor fi descrise în capitolul „Proteoglicani".

Amidonul este homoglicanul cel mai răspândit în lumea vegetală unde reprezintă rezerva glucidică principală. El este constituit din două componente:

- amiloza, în care resturile glucozil se leagă prin legături α- (1,4) -glucozidice:



- amilopectina, în care resturile glucozil se leagă nu numai prin legături α-(1,4)-glucozidice, ci şi prin legături α-(1,6)-glucozidice conferind moleculei o structură ramificată:



Masa moleculară a amilozei variază de la câteva mii la jumătate de milion. Nu este solubilă în apă, formând micelii hidratate care dau cu iodul o coloraţie albastră.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Amiloza formează structuri helicoidale, pasul helicei cuprinzând 4 - 5 resturi glucozil (Fig. VII. 5).

Masa moleculară a amilopectinei este de ordinul zecilor sau sutelor de milioane. Nu este solubilă în apă, formând soluţii coloidale sau micelare care dau cu iodul o coloraţie roşie.

Prezenţa ramificaţiilor în amilopectină duce la o moleculă de tip globular, foarte condensată (Fig. VII.6.)

Glicogenul este echivalentul animal al amidonului vegetal, reprezentând forma de depozitare a excesului de hidraţi de carbon. Rezerve semnificative de glicogen se găsesc în muşchi şi în ficat. Cantităţi mici de glicogen se găsesc în toate ţesuturile, inclusiv în creier. Din punct de vedere al structurii, glicogenul este asemănător amilopectinei, cu deosebirea că glicogenul, având un număr mai mare de legături 1,6 - glucozidice, este mai ramificat. Catenele laterale sunt formate în medie din 10-15 unităţi de glucoză, în centrul moleculei întâlnindu-se o ramificaţie la 3 - 5 unităţi de glucoză. Acest tip de organizare face ca glicogenul să prezinte o structură arborescentă (Fig. VII.7).

Glicogenul are o masă moleculară de ordinul milioanelor. In apă formează soluţii coloidale care cu iodul dau o coloraţie brun-roşcată ce nu dispare la cald.

VII.2. DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GLUCIDELOR

Glucidele ne parvin din alimentaţie sub formă de polizaharide (amidon, glicogen, pentozani, celuloză), dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză) şi monozaharide (glucoză, fructoză, galactoză, pentoze) într-un raport procentual ce variază cu vârsta. Întrucât singura formă absorbabilă este cea de monozaharid, este necesar ca polizaharidele şi dizaharidele să fie mai întâi hidrolizate la monozaharidele componente în cursul procesului de digestie.

Digestia amidonului, zahărul cel mai bogat în dietă, începe prin acţiunea amilazei salivare şi continuă în intestinul subţire sub acţiunea amilazei pancreatice. Ambele tipuri de amilază îşi încep acţiunea de la periferia moleculei spre centru, desfăcând exclusiv

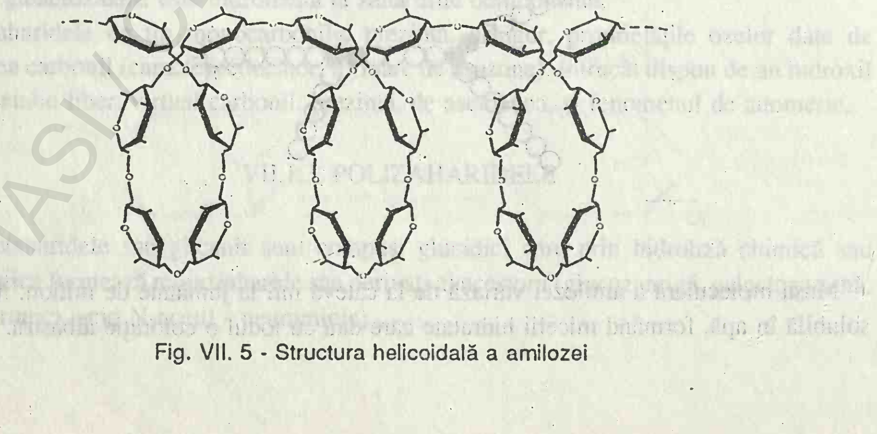


Fig. VII. 5 - Structura helicoidală a amilozei

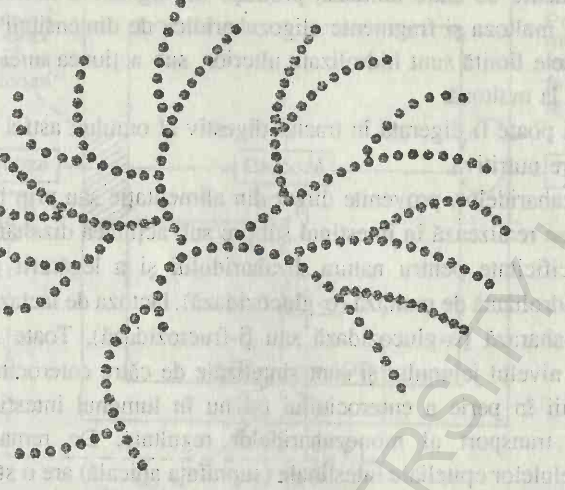


Fig. VII. 6 - Structura amilopectinei

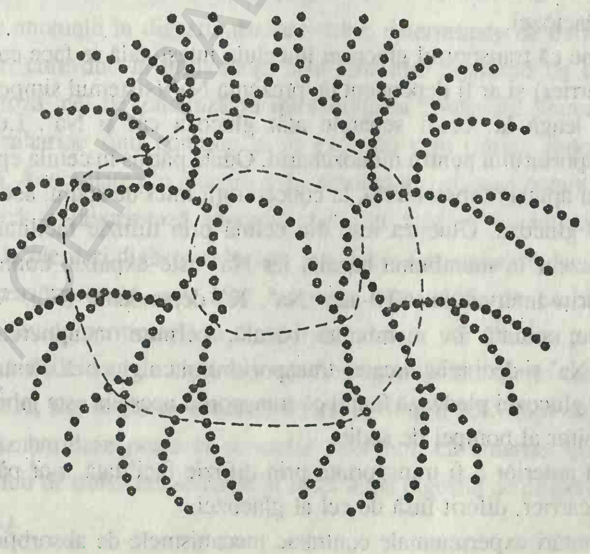


Fig. VII. 7 - Structura glicogenului

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

legături 1,4 - glucozidice. Cum legăturile 1,6 ca şi cele 1,4 din vecinătatea ramificaţiilor nu pot fi desfăcute de către amilază, produşii de digestie a amidonului sub acţiunea amilazei vor fi maltoza şi fragmente oligozaharidice de dimensiuni variabile - dextrine limită. Dextrinele limită sunt hidrolizate ulterior, sub acţiunea unei hidrolaze, amilo-1, 6-glucozidaza, la maltoză.

Celuloza nu poate fi digerată în tractul digestiv al omului, astfel încât ea este lipsită de orice valoare nutritivă.

Digestia dizaharidelor, provenite direct din alimentaţie sau prin hidroliza enzimatică a amidonului, se realizează în intestinul subţire sub acţiunea dizaharidazelor, enzime ce manifestă specificitate pentru natura dizaharidului şi a legăturii glucozidice. Astfel, maltoza este hidrolizată de maltază (α-glucozidază), lactoza de lactază (β-galactozidază), zaharoza de zaharază (α-glucozidază sau β-fructozidază). Toate aceste enzime sunt concentrate la nivelul jejunului şi sunt sintetizate de către enterocite. Ele acţionează la nivelul marginii în perie a enterocitului (şi nu în lumenul intestinal), în vecinătatea sistemului de transport al monozaharidelor rezultate. De remarcat că membrana plasmatică a celulelor epiteliale intestinale (suprafaţa apicală) are o structură microvilară, ceea ce măreşte substanţial suprafaţa activă în procesul de digestie şi absorbţie a zaharurilor.

Absorbţia monozaharidelor, respectiv a glucozei, fructozei, galactozei, manozei ca şi a unor pentoze, se realizează prin sistemul port hepatic şi implică două mecanisme posibile: transportul activ (energodependent), contra gradientului de concentraţie, şi difuzia facilitată.

Transportul activ este propriu ozelor cu structură piranozică având la C_2 aceeaşi configuraţie ca a glucozei şi la C_5 un grup metil substituit sau nesubstituit, respectiv glucozei şi galactozei.

Se presupune că transportul glucozei în celula intestinală se face cu participarea unui transportor (carrier) şi ar fi dependent de prezenţa Na^+ (sistemul simport glucoză-sodiu). Transportorul leagă la locuri separate atât glucoza cât şi Na^+. Legarea Na^+ creşte afinitatea transportorului pentru monozaharid. Odată pătrus în celula epitelială intestinală prin membrana apicală (absorbtivă), la concentraţii mici de sodiu, acesta este eliberat şi odată cu el şi glucoza. Glucoza iese din celulă prin difuzie facilitată, mediată de un transportor prezent în membrana bazală, iar Na^+ este expulzat contra gradientului de concentraţie prin intervenţia ATP-azei Na^+, K^+ dependente (Fig. VII.8). Activitatea acestei enzime, situată în membrana bazală, permite menţinerea gradientului de concentraţie a Na^+ şi deci reîncărcarea transportorului cu glucoză. Pentru acest mecanism de transport al glucozei pledează faptul că transportul acesteia este inhibat prin ouabaină, cunoscut inhibitor al pompei de sodiu.

Considerată anterior a fi transportată prin difuzie facilitată, s-ar părea că şi fructoza recurge la un carrier, diferit însă de cel al glucozei.

Unele constatări experimentale contrazic mecanismele de absorbţie propuse care nu par, în forma actuală, incontestabile.

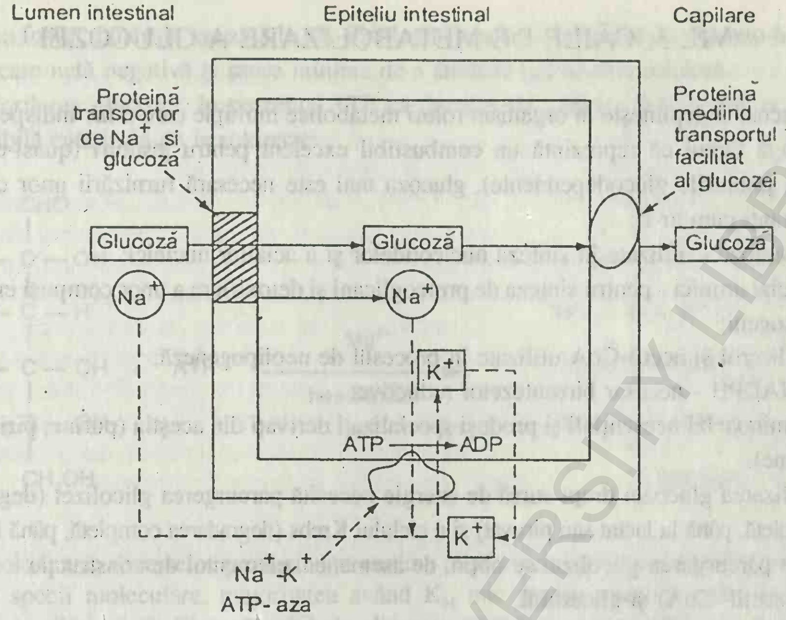


Fig. VII. 8 - Transportul glucozei prin mucoasa intestinală

VII.2.1. DEFICITE ENZIMATICE ÎN DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GLUCIDELOR

Există anumite anomalii în digestia dizaharidelor, determinate de deficitul enzimatic al dizaharidazelor, care duc la intoleranţă la dizaharide. Deficitul de lactază duce la intoleranţă la lactoză, cel de zaharază la intoleranţă la zaharoză. Semnele clinice ale intoleranţei la dizaharide sunt comune şi se exprimă prin dureri abdominale, diaree cronică, flatulenţă. Acumularea în intestin a dizaharidelor, compuşi osmotic activi, creşte presiunea osmotică şi favorizează intrarea apei din spaţiile interstiţiale în lumenul intestinal ducând la pierderi digestive de apă. Procesele fermentative declanşate de flora microbiană generează produşi care irită mucoasa intestinală (de ex. acid lactic); in extremis, aceasta devine permeabilă la dizaharide, care se vor elimina prin urină.

De menţionat că deficienţa de lactază poate fi moştenită, situaţie în care se manifestă imediat după naştere, sau se poate datora scăderii în timp a activităţii enzimatice.

Deficitul de dizaharidaze poate fi secundar unor boli ca enterite, colite, sprue. Se cunoaşte şi un deficit de trehalază, evidenţiat strict după ingestia de ciuperci tinere (unica sursă de trehaloză).

VII. 3. CĂILE DE METABOLIZARE A GLUCOZEI

Glucoza îndeplineşte în organism roluri metabolice multiple care o fac indispensabilă. Pe lângă faptul că reprezintă un combustibil excelent pentru ţesuturi (quasi-exclusiv pentru ţesuturile glucodependente), glucoza mai este necesară furnizării unor compuşi importanţi cum ar fi:

– pentoze - utilizate în sinteza nucleotidelor şi a acizilor nucleici;

– acizi uronici - pentru sinteza de proteoglicani şi detoxifiere a unor compuşi endogeni sau exogeni;

– glicerol şi acetil-CoA utilizate în procesul de neolipogeneză;

– NADPH - necesar biosintezelor reductive;

– aminoacizi neesenţiali şi produşi specializaţi derivaţi din aceştia (purine, pirimidine, porfirine).

Utilizarea glucozei drept sursă de energie necesită parcurgerea glicolizei (degradarea incompletă, până la lactat sau piruvat) şi a ciclului Krebs (degradarea completă, până la CO_2).

Prin parcurgerea glicolizei se obţin, de asemenea, elementul de construcţie a acizilor graşi (acetil~CoA) şi glicerolul.

Pentoze şi NADPH se obţin în cursul desfăşurării căii 6-fosfo-gluconat, iar acizi uronici în aşa-zisa cale a glucuronatului.

Sinteza de aminoacizi se realizează prin furnizarea de către glucoză a scheletului hidrocarbonat al acestora (α-cetoacizii rezultaţi în ciclul Krebs).

Angajarea glucozei în una sau alta dintre căile metabolice posibile va fi decisă de starea metabolică a ţesutului respectiv. În faza anabolică, caracterizată prin abundenţă de substrate energogene, rezultat al absorbţiei postprandiale, glucoza va fi transformată în piruvat şi apoi oxidată terminal în ciclul Krebs, în vederea asigurării resurselor energetice ale organismului. Utilizarea glucozei drept combustibil energogen este „permisă" în fază anabolică oricărui ţesut, atât celor glucodependente, cât şi celor glucoindependente (insulinodependente).

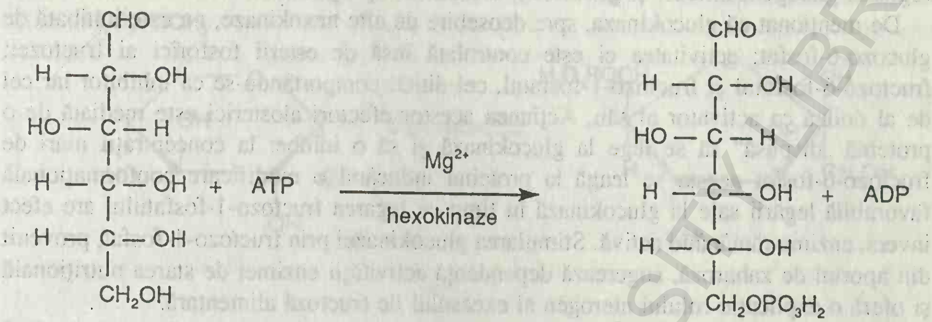
Cu precădere în ficat, dar şi în alte ţesuturi, variind cu specia, glicoliza se poate desfăşura exclusiv în vederea obţinerii elementelor de construcţie a trigliceridelor care vor fi depozitate în ţesutul adipos. Transformarea glucozei în triacilgliceroli, fosfolipide, şi colesterol are loc atunci când posibilităţile ficatului de a stoca glucoza sub formă de glicogen au fost depăşite (2-3 ore postprandial).

În faza catabolică - în perioade interprandiale sau în cursul unei hiperactivităţi fizice sau intelectuale - glucoza nu mai reprezintă combustibilul principal decât pentru ţesuturile glucodependente, care o obţin prin glicogenoliză şi gluconeogeneză hepatică. Sursă de energie pentru celelalte ţesuturi devin rezervele de lipide constituite în fază anabolică şi, in extremis, proteinele.

Metabolizarea glucozei prin oricare dintre căile enumerate este precedată, cu obligativitate, de fosforilare, condiţie necesară rămânerii ei în celulă. Într-adevăr,

gruparea fosfat, puternic ionizată la pH-fiziologic, conferă moleculei de glucozo-6-fosfat o încărcare netă negativă şi şanse minime de a străbate membrana celulară.

Fosforilarea glucozei, în prezenţa ATP ca donator de grupare fosfat, este o reacţie ireversibilă catalizată de hexokinaze:



Hexokinazele diverselor ţesuturi sunt enzime alosterice ce se prezintă sub forma mai multor specii moleculare, majoritatea având K_M mic pentru glucoză (prin excelenţă, izoenzima din creier). Ele sunt inhibate alosteric, temporar şi reversibil, la concentraţii mari ale glucozo-6-fosfatului, produsul acţiunii lor. Dacă necesităţile celulei la un moment dat impun inhibarea uneia dintre căile de metabolizare a glucozei, acumularea temporară de glucozo-6-fosfat în celulă va opri fosforilarea glucozei până ce aceasta va fi consumată, evitându-se sechestrarea inutilă a fosfatului în celulă. Hexokinazele sunt inhibate şi de acizii graşi. Scăderea captării glucozei în condiţiile unei concentraţii intracelulare mari de acizi graşi poate fi explicată prin prisma acestei constatări.

În ficat, are loc, de asemenea, fosforilarea glucozei sub acţiunea unei hexokinaze, desemnată drept hexokinaza D sau glucokinaza, izoenzima majoră din ficat. Spre deosebire de alte hexokinaze, care pot utiliza drept substrat şi alte hexoze, glucokinaza utilizează exclusiv glucoza. Deosebirea fundamentală faţă de acestea o constituie însă diferenţa valorilor K_M pentru glucoză. În timp ce hexokinazele altor ţesuturi au un K_M mic (~0,1 mM) deci afinitate mare pentru glucoză, glucokinaza are un K_M mare (~10 mM). Valorile mici ale K_M permit hexokinazelor să lucreze la V_{max} şi să asigure necesarul de glucoză pentru ţesuturi chiar la concentraţii mici ale acesteia în sânge, ceea ce este esenţial pentru ţesuturile glucodependente. Glucokinaza hepatică este activă numai în condiţiile unui aport masiv de glucoză (valori peste 5 mM ale glicemiei) care, depăşind nevoile de moment ale organismului, va fi depusă, după conversia la glucozo-6-fosfat, ca glicogen. La concentraţii mari de glucoză (de ex. postprandial) o hexokinază hepatică oarecare ar fi incapabilă să asigure fosforilarea glucozei în ritmul impus de necesităţile restabilirii glicemiei, întrucât ea este saturată chiar la concentraţii fiziologice de glucoză.

Cum viteza de fosforilare a glucozei sub acţiunea glucokinazei creşte pe măsură ce concentraţia intracelulară a acesteia creşte, glucokinaza poate fi considerată o enzimă potrivită la locul potrivit.

Prezenţa glucokinazei în ficat asigură acestuia un rol central în reglarea captării glucozei şi menţinerea glicemiei. Fiind o enzimă inductibilă, transcrierea genei sale este

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

activată de insulină, unui aport glucidic substanţial îi corespund, evident, cantităţi mari de enzimă în ficat şi posibilitatea restabilirii prompte a glicemiei. Deşi preluarea glucozei de către celulele parenchimului hepatic nu este insulino-dependentă, scăderea activităţii glucokinazei în diabet justifică, alături de perturbarea depunerii şi utilizării glucozei (vezi reglarea glicogenosintezei şi glicolizei), instalarea hiperglicemiei.

De menţionat că glucokinaza, spre deosebire de alte hexokinaze, nu este inhibată de glucozo-6-fosfat; activitatea ei este controlată însă de esterii fosforici ai fructozei: fructozo-6-fosfatul şi fructozo-1-fosfatul, cel dintâi comportându-se ca inhibitor iar cel de al doilea ca activator al său. Acţiunea acestor efectori alosterici este mediată de o proteină „dispusă" să se lege la glucokinază şi să o inhibe; la concentraţii mari de fructozo-6-fosfat acesta se leagă la proteină inducând o modificare conformaţională favorabilă legării sale la glucokinază în timp ce legarea fructozo-1-fosfatului are efect invers, enzima rămânând activă. Stimularea glucokinazei prin fructozo-1-fosfat, provenit din aportul de zaharoză, sugerează dependenţa activităţii enzimei de starea nutriţională şi oferă o explicaţie rolului aterogen al excesului de fructoză alimentară.

VII.3.1. GLICOLIZA (SECVENŢA EMBDEN - MEYERHOF - PARNAS)

Funcţia majoră a glucozei în organism este aceea de a servi drept sursă de energie metabolică. Eliberarea energiei încorporate în molecula de glucoză se realizează fie parţial, prin degradarea sa la piruvat, fie total, prin oxidare la CO_2.

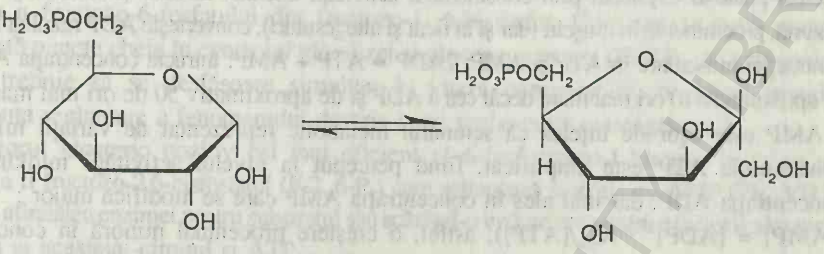
Oxidarea glucozei până la piruvat presupune parcurgerea glicolizei - cale metabolică elucidată de către Embden, Meyerhof şi Parnas. Piruvatul rezultat în glicoliză este oxidat în continuare până la CO_2 prin antrenarea sa în ciclul Krebs, în condiţiile în care ţesuturile dispun de oxigen sau este redus la lactat, în condiţiile în care aportul de oxigen este scăzut.

Desfăşurarea glicolizei, proces puternic exergonic ($\Delta G°' = -47$ kcal/mol) se realizează în scopul procurării ATP. În condiţiile unei disponibilităţi crescute de glucoză (postprandial) toate ţesuturile, inclusiv cele insulino-dependente (ţesutul adipos, muşchiul), vor utiliza glucoza în vederea obţinerii resurselor energetice.

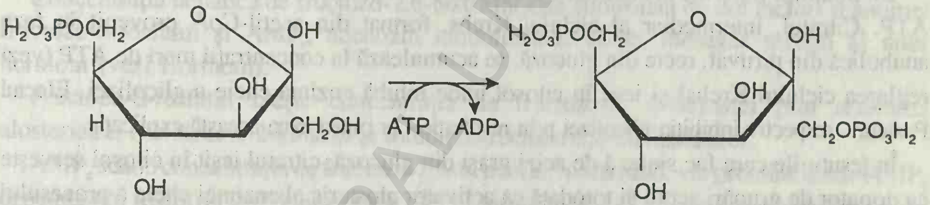
În ficat şi alte ţesuturi, glicoliza reprezintă şi modalitatea metabolică de transformare a glucozei, oferită în cantităţi mari postprandial, în lipide de rezervă, respectiv trigliceride, formă ideală de depozitare a energiei la care se va face apel în condiţiile în care concentraţia glucozei în sânge este redusă. Glicoliza furnizează atât componenta glicerol a trigliceridelor cât şi elementul de construcţie a acizilor graşi care este acetil~CoA (vezi metabolismul lipidelor). De menţionat că ficatul utilizează componenta glicerol (ca glicerolfosfat) şi în vederea obţinerii fosfolipidelor, iar componenta acetil~CoA şi în scopul sintezei colesterolului. Aceşti compuşi de natură lipidică vor fi exportaţi ţesuturilor extrahepatice, cu precădere ţesutului adipos, sub formă de lipoproteine.

Secvenţa glicolitică se desfăşoară în citosol şi presupune următoarele transformări enzimatic catalizate:

1. Conversia glucozo-6-fosfatului la fructozo-6-fosfat. Izomerizarea α-glucopiranozo-6-fosfatului la β-fructofuranozo-6-fosfat[1] se realizează sub acţiunea glucozo-6-fosfat izomerazei. Enzima realizează izomerizarea celor două oze într-o reacţie reversibilă ce necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+} sau Mn^{2+};



2. Fosforilarea fructozo-6-fosfatului (F-6-P)
Fosforilarea β-fructofuranozo-6-fosfatului la β-fructofuranozo-1,6 -bisfosfat (F-1, 6-P_2) se realizează într-o reacţie ireversibilă (ΔG°' = - 3,4 kcal) catalizată de 6-fosfofructo-1-kinază (6-FF-1K).



Dintre toate enzimele implicate în glicoliză, 6-fosfofructo-1-kinaza este, atât în ficat cât şi în rinichi şi muşchi, enzima cu activitatea cea mai redusă. Amploarea degradării hexozomonofosfaţilor depinde, în aceste ţesuturi, de viteza conversiei fructozo-6-fosfat → fructozo-1,6-bisfosfat, care este deci etapa limitantă de viteză în glicoliză.

6-Fosfofructo-1-kinaza este o enzimă alosterică a cărei activitate este controlată de numeroşi efectori metabolici, pozitivi sau negativi.

Astfel, 6-fosfofructo-1-kinaza este sensibilă la variaţiile stării energetice a celulei, ATP comportându-se ca inhibitor alosteric. Concentraţiile mari de ATP intracelular inhibă activitatea enzimei prin legarea la un situs alosteric, diferit de locul activ ce leagă ATP ca substrat, sub forma complexului Mg^{2+}–ATP.

---

[1]Forma anomerică preferată de enzimele glicolizei (ca şi de cele ale şuntului pentozelor) este forma β, aşa cum atestă studii recente de cinetică enzimatică şi RMN.

De menţionat că AMP (ca şi ADP) se comportă ca efector pozitiv, suprimând inhibiţia prin ATP.

Constatarea că în muşchi fluxul glicolitic poate varia de peste 100 de ori în timp ce concentraţia ATP variază cu mai puţin de 10% în trecerea de la starea de repaos la activitate intensă poate fi explicată prin considerarea activităţii adenilat kinazei (miokinaza). Această enzimă, proeminentă în muşchi (dar şi în ficat şi alte ţesuturi), converteşte ADP rezultat în cursul contracţiei musculare în ATP şi AMP: 2ADP ⇌ ATP + AMP. Intrucât concentraţia ATP este de aproximativ 10 ori mai mare decât cea a ADP şi de aproximativ 50 de ori mai mare decât a AMP este uşor de înţeles că semnalul metabolic reprezentat de variaţii minore în concentraţia ATP este amplificat, fiind perceput la nivelul activităţii miokinazei în concentraţia ADP, dar mai ales în concentraţia AMP care se modifică major : ($[AMP] = [ADP]^2 \cdot K_{ech}/[ATP]$); astfel, o creştere procentual minoră în concentraţia ATP, incapabilă să inhibe substanţial activitatea 6-fructozo-1-kinazei, antrenează o scădere procentual majoră a concentraţiei AMP, suficientă pentru a deprima semnificativ activitatea enzimei.

6-Fosfofructo-1-kinaza este inhibată, de asemenea, de fosfoenolpiruvat şi 1,3 bisfosfoglicerat, intermediari macroergici ai glicolizei.

Dependenţa activităţii 6-fosfofructo-1-kinazei de modificări minore în statusul energetic celular permite un control riguros al cantităţii de glucoză antrenată în glicoliză.

Un inhibitor puternic al enzimei s-a dovedit a fi citratul, care accentuează inhibiţia prin ATP. Citratul, intermediar al ciclului Krebs, format din acetil-CoA provenit în faza anabolică din piruvat, recte din glucoză, se acumulează la concentraţii mari de ATP (vezi reglarea ciclului Krebs) şi iese în citosol unde inhibă enzima cheie a glicolizei. Efectul Pasteur - respectiv inhibiţia glicolizei prin respiraţie - ar putea avea această explicaţie.

În ţesuturile care fac sinteză de acizi graşi din glucoză, citratul ieşit în citosol serveşte ca donator de grupări acetil şi totodată ca activator alosteric al enzimei cheie a procesului de neolipogeneză. Acumularea de citrat în citosol reprezintă semnalul celular al satisfacerii nevoilor energetice ale ţesuturilor ca şi al necesarului de intermediari biosintetici al acestora.

Inhibiţia prin citrat a 6-fosfofructo-1-kinazei are şi o altă raţiune în ţesuturile care utilizează de preferinţă acizii graşi ca sursă energetică (muşchiul scheletic şi cardiac) ca şi în ţesuturile glucoindependente în perioadele catabolice. În fază catabolică raportul glucagon insulină mare, care-i este propriu, activează lipoliza în ţesutul adipos având ca rezultat aflux de acizi graşi spre ţesuturi. Degradarea acestora prin β-oxidare duce la acetil-CoA mitosolic care este introdus în ciclul Krebs, via oxaloacetat, sub formă de citrat. Când concentraţia de citrat depăşeşte posibilităţile de utilizare în ciclul Krebs, citratul acumulat iese în citosol şi, desigur, inhibă 6-FF-1-K, ceea ce se soldează cu acumulare de glucozo-6-fosfat, inhibitor alosteric al hexokinazelor extrahepatice. Reducerea capacităţii de preluare a glucozei din circulaţie, subsecventă utilizării acizilor graşi, reprezintă una dintre modalităţile prin care ţesuturile glucoindependente cruţă glucoza sangvină care, în condiţii de austeritate glucidică, trebuie să satisfacă, exclusiv, necesităţile ţesuturilor glucodependente.

O particularitate importantă a 6-fosfofructo-1-kinazei o reprezintă activarea prin produsul acţiunii sale, fructozo-1, 6-bisfosfatul.

Această stimulare prin produs final (feed-back stimulare, proces rar întâlnit, opus feed-back inhibiţiei) prezintă un interes major întrucât fructozo-1, 6-bisfosfatul este în acelaşi timp un inhibitor al fructozo-1, 6-bisfosfatazei, enzimă ce catalizează reacţia inversă, de formare a fructozo-6-fosfatului din fructozo-1, 6-bisfosfat. Cum aceste două enzime reprezintă puncte cheie în controlul glicolizei şi gluconeogenezei (GNG), căi antagoniste ce nu trebuie să se desfăşoare simultan la viteze comparabile, se poate imagina importanţa reglatoare a fenomenului descris (vezi reglarea gluconeogenezei).

Efectorul alosteric pozitiv cel mai eficient al 6-fosfofructo-1-kinazei hepatice s-a dovedit a fi fructozo-2,6-bisfosfatul (F-2, 6-P_2) care acţionează sinergic cu AMP (Fig. VII.9); el creşte afinitatea enzimei pentru substratul său scăzând-o însă pe cea pentru efectorii alosterici negativi ai acesteia: citratul şi ATP.

Moleculă cu rol de semnal, de integrator metabolic, F-2, 6-P_2 este sintetizat şi degradat de către o enzimă bifuncţională: fosfofructo-2-kinaza/fructozo-2, 6-bisfosfataza (FF-2-K/F-2, 6-P_2-aza). Enzima, izolată şi secvenţializată, cuprinde 470 de aminoacizi care pot fi divizaţi în două domenii: domeniul kinazic, aminoterminal (reziduurile 1-249) şi domeniul fosfatazic-carboxiterminal (reziduurile 250-470). Enzima este reglată covalent, prin interconversie fosfo -defosfo. Prin fosforilare, sub acţiunea proteinkinazei A, AMP_c dependentă, activitatea kinazică scade în timp ce activitatea fosfatazică creşte.

Concentraţia hepatică de fructozo-2,6-bisfosfat este controlată de doi factori şi anume: fructozo-6-fosfatul şi AMP_c, adenozin monofosfatul ciclic, mesager secund al unor hormoni (vezi Hormoni).

Fructozo-6-fosfatul creşte concentraţia de fructozo-2, 6-bisfosfat prin activarea alosterică a fosfofructo-2-kinazei şi inhibiţia fructozo-2,6-bisfosfatazei;

AMP_c scade concentraţia de fructozo-2,6-bisfosfat, inactivând, via proteinkinaza-AMP_c dependentă, fosfofructo-2-kinaza (inactivă în formă fosfo) şi activând simultan fructozo-2,6-bisfosfataza (activă în formă fosfo) (Fig. VII.10).

Dependenţa concentraţiei de fructozo-2,6-bisfosfat de AMPc face 6-fosfofructo-1-kinaza susceptibilă la control hormonal şi explică, cel puţin parţial, efectul glucagonului şi insulinei asupra glicolizei, gluconeogenezei şi lipogenezei. Scăzând concentraţia fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al 6-fosfofructo-1-kinazei şi inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, glucagonul inhibă glicoliza şi lipogeneza şi activează gluconeogeneza.

Dependenţa concentraţiei de fructozo-2,6-bisfosfat de factori nutriţionali (concentraţia de fructozo-6-fosfat, respectiv de glucozo-6-fosfat) şi hormonali (prezenţa sau absenţa glucagonului) face ca fructozo-2,6-bisfosfatul să fie considerat semnal de abundenţă glucidică, în contrast cu AMPc, considerat semnal de absenţă a glucozei (hunger signal).

Fructozo-2,6-bisfosfatul va decide fluxul de substrate fie spre glicoliză fie spre gluconeogeneză.

Concentraţiile fructozo-2,6-bisfosfatului sunt reduse în inaniţie şi diabet.

Se consideră că acţiunea unor factori mitogeni, oncogeni şi promotori tumorali asupra glicolizei s-ar realiza prin controlul activităţii FF-2-K/F-2,6P_2-aza.

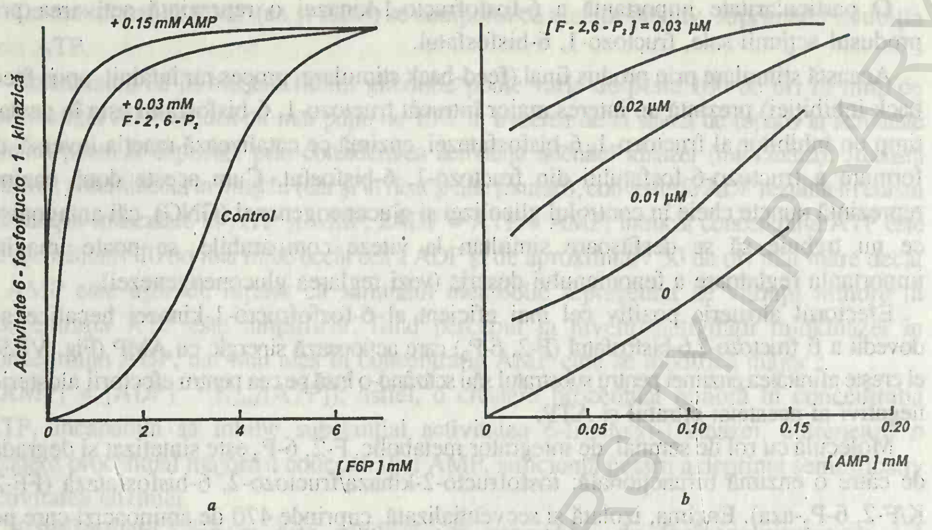


Fig. VII. 9 - Activarea alosterică a 6-fosfofructo-1-kinazei prin AMP şi fructozo-2,6 bisfosfat
a - cinetica sigmoidală devine hiperbolică
b - efectul sinergic al AMP şi F-2,6-P_2

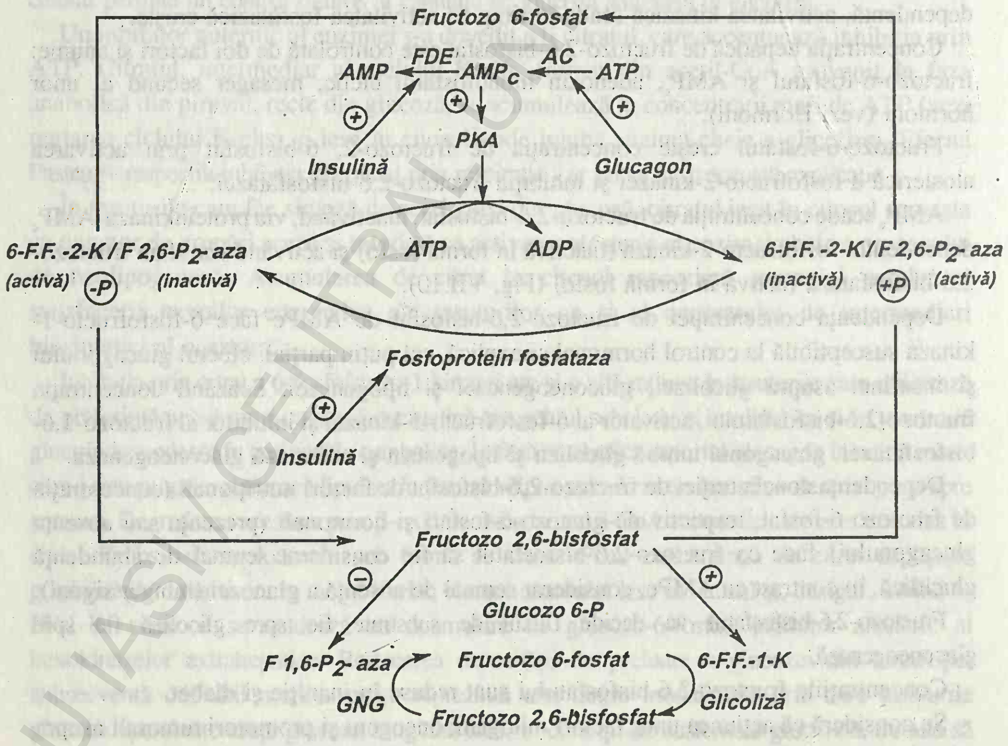
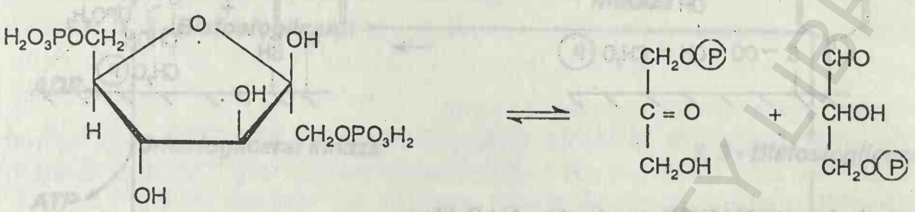


Fig. VII. 10 - Reglarea concentraţiei fructozo-2,6-bisfosfatului în hepatocit

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Scindarea fructozo-1,6-bisfosfatului

Fructozo-1,6-bisfosfatul este scindat la două trioze: gliceraldehid-3-fosfat şi dihidroxiaceton-fosfat, într-o reacţie reversibilă catalizată de o liază, fructozo-1,6 - bisfosfat liaza sau aldolaza:



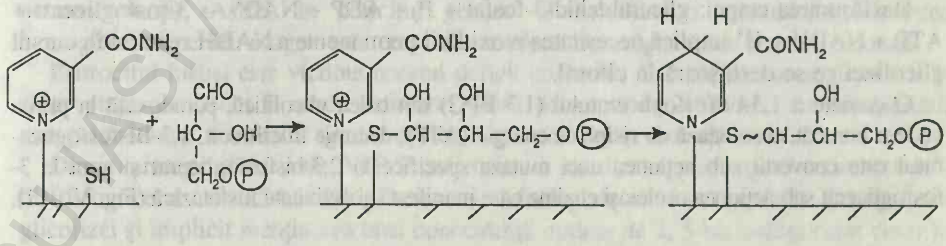
Între esterii fosforici ai triozelor obţinute se stabileşte un echilibru, conversia unuia în celălalt fiind catalizată de o triozofosfat izomerază:

Cum forma aldehidică este foarte reactivă, toate transformările ulterioare vor avea ca punct de plecare gliceraldehid-3-fosfatul, fapt ce implică deplasarea echilibrului de mai sus în sensul formării acesteia, pe măsura utilizării sale.

4. Oxidarea fosforilantă a gliceraldehid-3-fosfatului

Oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului la 3-fosfoglicerat este catalizată de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază şi implică participarea obligatorie în procesul catalitic a unor grupări sulfhidril ce cooperează cu NAD legat ferm de enzimă (spre deosebire de alte dehidrogenaze NAD dependente). Enzima este inhibată de iodoacetat şi alţi reactivi tiolici. Procesul de oxidare presupune următoarele etape:

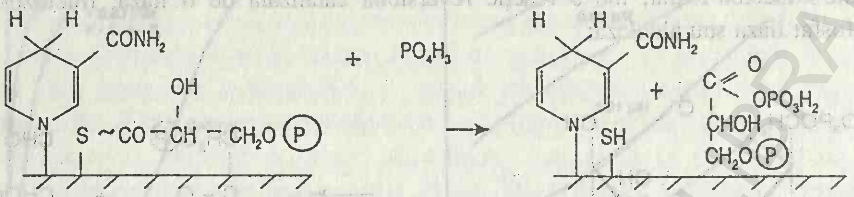
a. adiţia unei grupări -SH din centrul activ al enzimei la gliceraldehid-3-fosfat, cu formarea unui semitioacetal (analog semiacetalilor) şi oxidarea semitioacetalului pe seama NAD legat, cu formarea unui tioester:



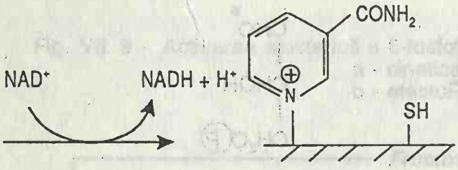
b. fosforoliza tioesterului cu formarea 1,3-bisfosfogliceratului şi eliberarea grupării -SH

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

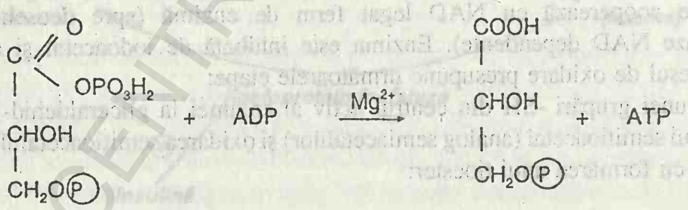
a enzimei:



c. deplasarea NADH legat de către NAD liber:



De remarcat că, 1,3-bisfosfogliceratul conţine o legătură acilfosfat macroergică (prin hidroliză eliberează 12 kcal/mol). Cum legătura fosfat-terminală a ATP este de ordinul a 8 kcal/mol, rezultă posibilitatea formării unei molecule de ATP prin transferul restului fosforil de pe 1,3-bisfosfoglicerat pe ADP (fosforilare la nivelul substratului). Reacţia este catalizată de fosfoglicerat kinază:



Desfăşurarea etapei: gliceraldehid-3-fosfat + P_i + ADP + NAD^+ → 3-fosfoglicerat + ATP + NADH + H^+ implică necesitatea reoxidării permanente a NADH rezultat în cursul glicolizei ce se desfăşoară în citosol.

O deviere a 1,3-bisfosfogliceratului (1,3 BPG) din calea glicolitică, paradoxală la prima vedere întrucât se soldează cu risipă de energie (ATP), decurge în eritrocit. 1,3-Bisfosfogliceratul este convertit sub acţiunea unei mutaze specifice la 2,3-bisfosfoglicerat şi apoi la 3-fosfoglicerat sub acţiunea aceleiaşi enzime care manifestă şi activitate fosfatazică (Fig. VII-11).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

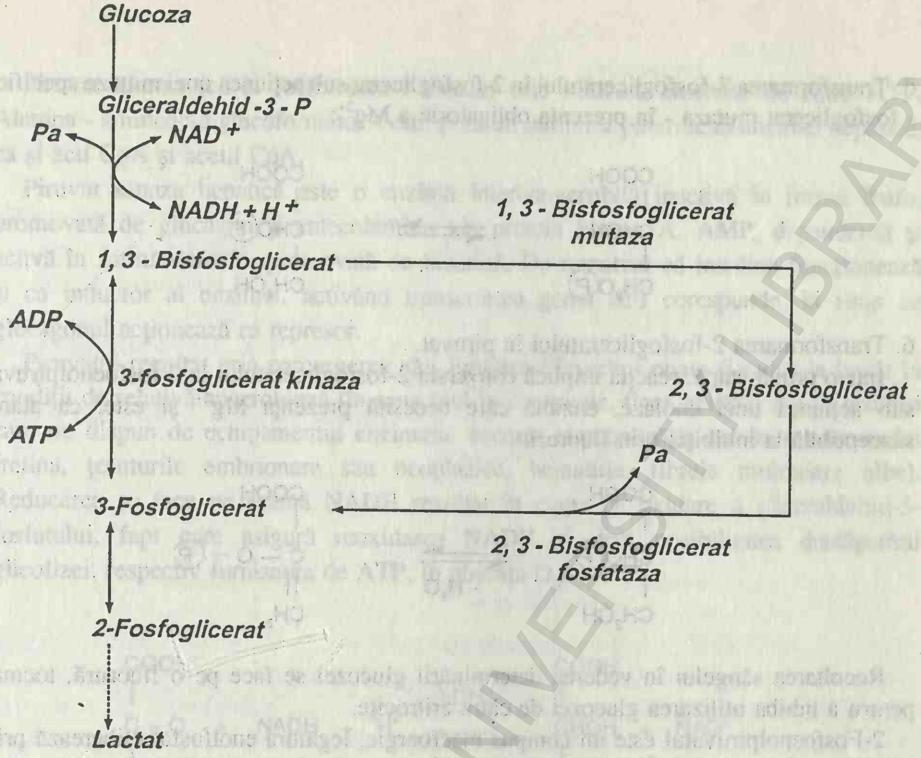


Fig. VII. 11 - Șuntul 2,3-bisfosfoglicerat kinazei în eritrocit (by pass-ul 3-fosfoglicerat kinazei)

2,3-Bisfosfogliceratul este un ester bisfosforic esențial în exercitarea funcției de transportor de oxigen a hemoglobinei. Acest ligand (efector alosteric), prezent în eritrocit la concentrații echimoleculare cu hemoglobina, scade marcat afinitatea acesteia pentru oxigen, favorizând disocierea complexului Hb.4O_2 și deci oxigenarea țesuturilor.

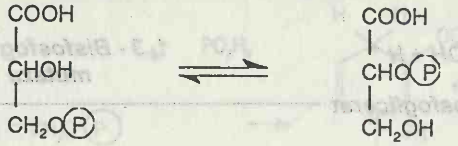
Din cantitatea de glucoză angajată în glicoliză aproximativ 25 la sută urmează în eritrocit șuntul 2,3-bisfosfoglicerat.

Viteza de desfășurare a glicolizei modifică, desigur, afinitatea pentru oxigen a hemoglobinei; deficite enzimatice în glicoliză pot duce fie la creșterea, fie la scăderea concentrației de 2,3-bisfosfoglicerat, funcție de situarea deficitului - înainte de sinteza 1,3-bisfosfogliceratului (scădere) sau după (creștere, prin acumularea produșilor netransformați). Astfel, în deficitul genetic al hexokinazei eritrocitare afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este crescută iar oferta de oxigen către țesuturi scăzută.

Eritrocitul însuși este victima acestui deficit enzimatic întrucât blocarea glicolizei în chiar etapa de debut îi scade dramatic șansa de a obține ATP necesar funcționării pompelor ionice, rezultatul fiind swellingul eritrocitului și liza ulterioară.

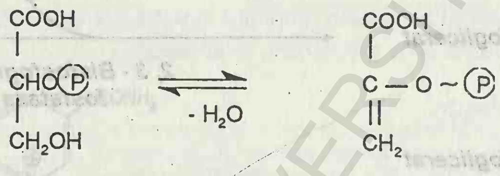
Diminuarea producerii de ATP în eritrocit, ca rezultat al parcurgerii secvenței 1,3-bisfosfoglicerat $\rightarrow$ 2,3-bisfosfoglicerat $\rightarrow$ 3-fosfoglicerat, face posibilă desfășurarea glicolizei și implicit menținerea unei concentrații optime de 2, 3-bisfosfoglicerat chiar în condițiile în care necesitățile de ATP ale eritrocitului sunt reduse.

5. Transformarea 3-fosfogliceratului în 2-fosfoglicerat sub acţiunea unei mutaze specifice - fosfoglicerat mutaza - în prezenţa obligatorie a Mg^{2+}:



6. Transformarea 2-fosfogliceratului în piruvat.

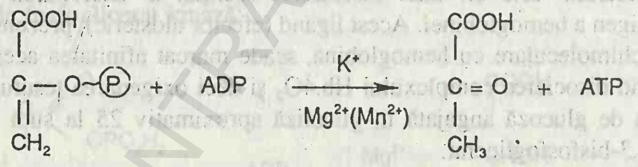
Într-o primă etapă, reacţia implică conversia 2-fosfogliceratului la 2-fosfoenolpiruvat sub acţiunea unei enolaze, enzimă care necesită prezenţa Mg^{2+} şi este, ca atare, susceptibilă la inhibiţia prin fluoruri:



Recoltarea sângelui în vederea determinării glucozei se face pe o fluorură, tocmai pentru a inhiba utilizarea glucozei de către eritrocite.

2-Fosfoenolpiruvatul este un compus macroergic; legătura enolfosfat eliberează prin hidroliză –14 kcal/mol. În prezenţa piruvat kinazei gruparea fosforil este transferată pe ADP cu formarea unei molecule de ATP.

În această etapă a glicolizei se formează o nouă moleculă de ATP prin fosforilare la nivelul substratului:



Piruvat kinaza se prezintă sub forma a două izoenzime: de tip L, proprie ficatului, şi de tip M, proprie muşchiului. Izoenzimele de tip L sunt enzime alosterice, tetrameri, susceptibile la acţiunea a numeroşi efectori metabolici: etapa catalizată de piruvat kinază reprezintă, din acest motiv, un punct de control important al căii glicolitice. Printre efectorii enzimei hepatice se numără fructozo-1, 6-bisfosfatul care funcţionează ca activator. Activarea unei etape dintr-o secvenţă de reacţii printr-un metabolit, substrat al unei etape anterioare poartă numele de feed-forward stimulare. Exprimând activitatea enzimei limitantă de viteză, fructozo-1, 6-bisfosfatul „previne" enzima, situată în aval, asupra cantităţii de fosfoenolpiruvat căreia va trebui să-i facă faţă, ajustându-i corespunzător activitatea. Alături de feed-back inhibiţie şi feed-back stimulare, feed forward stimularea reprezintă o modalitate de realizare a unor interacţiuni metabolice complexe având ca scop desfăşurarea armonioasă a proceselor vitale (vezi reglarea gluconeogenezei).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Piruvat kinaza (ca şi fosfofructo-1-kinaza) este inhibată alosteric de către ATP. Alanina - aminoacid glucoformator - este şi ea un inhibitor puternic al enzimei hepatice, ca şi acil CoA şi acetil CoA.

Piruvat kinaza hepatică este o enzimă interconvertibilă inactivă în formă fosfo, promovată de glucagon şi catecolamine via protein kinaza A, AMP_c dependentă şi activă în formă defosfo, promovată de insulină. De remarcat că insulina funcţionează şi ca inductor al enzimei, activând transcrierea genei ce-i corespunde, în timp ce glucagonul acţionează ca represor.

Piruvatul rezultat prin parcurgerea căii Embden-Meyerhof poate fi redus la lactat în condiţii de relativă anaerobioză (în muşchiul în contracţie, ficat, rinichi) sau în ţesuturi care nu dispun de echipamentul enzimatic necesar metabolizării aerobe a piruvatului (retina, ţesuturile embrionare sau neoplazice, hematiile, fibrele musculare albe). Reducerea se face pe seama NADH rezultat în etapa de oxidare a gliceraldehid-3-fosfatului, fapt care asigură reoxidarea NADH şi deci posibilitatea desfăşurării glicolizei, respectiv furnizarea de ATP, în absenţa O_2:

$$\begin{array}{l} COOH \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_3 \end{array} + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} + NAD^+$$

Lactatul este „trimis" pe cale sanguină ficatului, miocardului şi rinichiului unde se reoxidează, în prezenţa LDH, la piruvat care va servi ca substrat pentru gluconeogeneză. Glucoza rezultată din lactatul muscular poate fi furnizată muşchiului, care o va utiliza, formând din nou lactat (vezi ciclul Cori).

Abilitatea glicolizei de a funcţiona în condiţii de anaerobioză o consacră drept cale unică de supravieţuire (sinteză de ATP) pentru unele ţesuturi într-o astfel de conjunctură. Mai mult, prezenţa enzimelor glicolizei în concentraţii mari îi permite acestei căi să producă ATP mult mai rapid decât o face degradarea aerobă, chiar dacă producerea de ATP este mai eficientă în prezenţa oxigenului. De menţionat că funcţionarea glicolizei este limitată de acumularea acidului lactic percepută de FF-1-K care-şi deprimă activitatea la pH mai mic de 7.

În condiţii de aerobioză, piruvatul este convertit la acetil ~CoA care va servi ca substrat al ciclului Krebs, asigurându-se astfel oxidarea totală a glucozei. NADH rezultat în glicoliză este reoxidat în lanţul respirator (vezi metabolism energetic).

În ficat, acetil ~CoA rezultată din glucoză serveşte cu precădere sintezei de lipide în cadrul procesului de neolipogeneză.

În Fig. VII.12 este redată schema generală a glicolizei.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

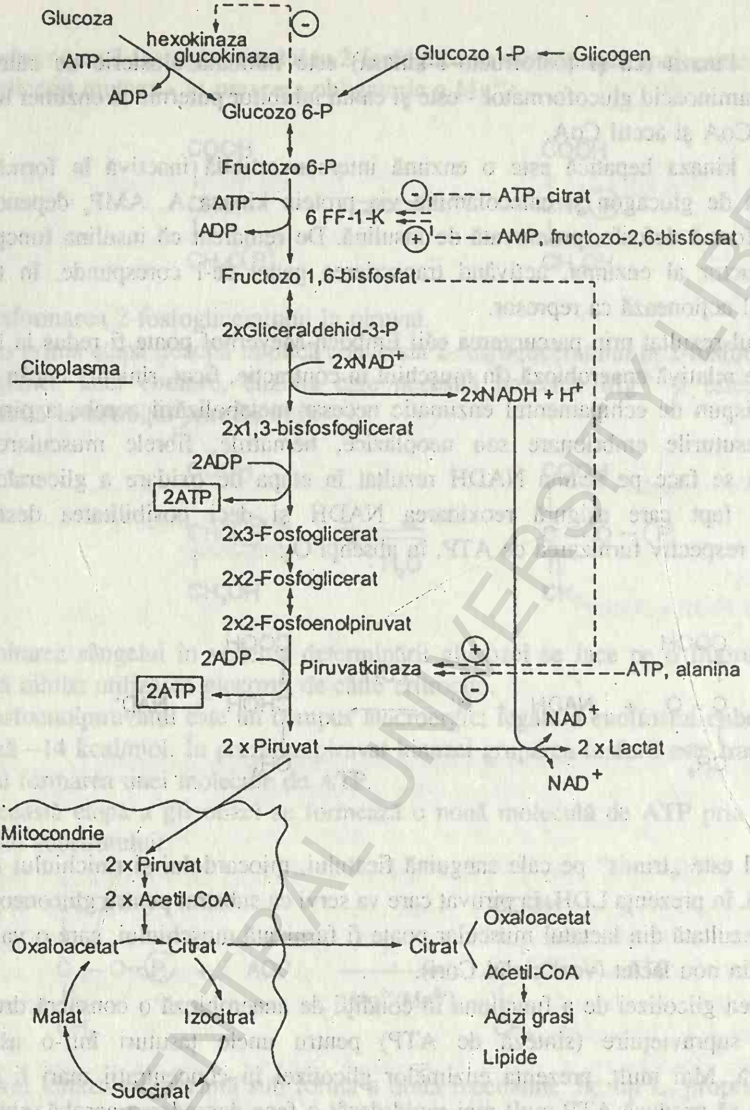


Fig. VII. 12 - Glicoliza (reacţii şi reglarea procesului)

BILANŢUL ENERGETIC AL GLICOLIZEI

Degradarea glucozei până la lactat reprezintă un proces exergonic ce eliberează o cantitate redusă din conţinutul energetic al glucozei. Energia eliberată este parţial încorporată sub formă de ATP. De remarcat că în procesul de glicoliză anaerobă energia nu se eliberează prin oxidarea NADH la nivelul lanţului respirator, urmată de cuplarea cu fosforilarea, ci exclusiv prin fosforilare la nivelul substratului. În aceste

condiţii glicoliza îşi asigură „pe cont propriu" reoxidarea echivalenţilor reducători, NADH rezultat în etapa gliceraldehidfosfat dehidrogenazică fiind reoxidat la NAD în cursul reacţiei de trecere a piruvatului la lactat.

Etapele de fosforilare la nivelul substratului, în care energia încorporată într-un substrat macroergic este transferată ADP, cu formarea ATP, sunt:

– conversia 1,3-bisfosfogliceratului la 3-fosfoglicerat;

– conversia fosfoenolpiruvatului la piruvat.

Cum dintr-o moleculă de glucoză rezultă două molecule de trioze, cantitatea de ATP formată este de 4 moli ATP per mol glucoză transformată în lactat. Câştigul energetic net este însă de numai 2 moli ATP dacă degradarea porneşte de la glucoză, întrucât reacţiile catalizate de kinaze şi anume:

$$\text{glucoză} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{glucozo-6-fosfat}$$

$$\text{fructozo-6-fosfat} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{fructozo-1, 6-bisfosfat}$$

consumă 2 moli ATP. Dacă degradarea porneşte de la glicogen câştigul net este de 3 moli ATP întrucât glucozo-6-fosfatul se obţine prin fosforoliza glicogenului, neconsumatoare de ATP. Considerând că energia eliberată la hidroliza legăturii fosfat terminale din ATP este de 7,3 kcal/mol, cantitatea de energie eliberată în cursul glicolizei este de 7,3x2=14,6 kcal/mol glucoză, respectiv 7,3x3=21,9 kcal/mol glucoză. Cantitatea de energie eliberată este relativ mică, astfel încât glicoliza anaerobă pare neavantajoasă din punct de vedere energetic. Viteza foarte mare a fluxului glicolitic permite însă furnizarea unei cantităţi de energie care să satisfacă, cel puţin pentru perioade relativ scurte, necesităţile energetice ale ţesuturilor în absenţa oxigenului. Consumul crescut de glucoză face totuşi din glicoliză o cale neeconomică.

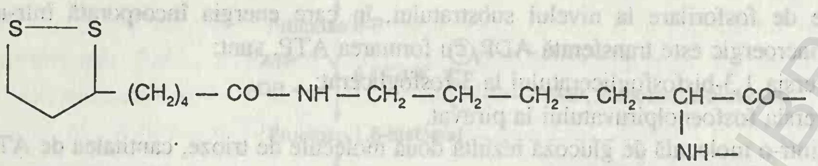
Dacă anaerobioza este de scurtă durată şi în sistem apare oxigen, lactatul este oxidat la piruvat. În condiţii de aerobioză piruvatul, format prin parcurgerea căii Embden-Meyerhof de către glucoză, este oxidat până la CO_2 şi H_2O în scopul eliberării integrale a energiei încorporate în molecula glucozei. Oxidarea finală a oricărui metabolit presupune antrenarea acestuia în ciclul Krebs. Admisia piruvatului în ciclul Krebs implică conversia la acetil ~CoA şi se realizează prin decarboxilarea sa oxidativă în matrixul mitosolic. Transportul piruvatului în mitosol este efectuat de un transportor specializat şi presupune cotransportul unui proton (mecanism simport).

VII.3.2. DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A PIRUVATULUI

Este un proces mitosolic complex ce presupune colaborarea următoarelor enzime: (E) şi cofactori:

– E_1 - piruvat dehidrogenaza (decarboxilantă), constituită din două subunităţii: $E_{1\alpha}$ şi $E_{1\beta}$ având ca grupare prostetică tiamin pirofosfatul (TPP):

– E_2 - lipoil reductaz transacetilaza, având ca grupare prostetică acidul lipoic. De menţionat că acidul lipoic se leagă la enzimă prin gruparea ε - amino a unei molecule de lizină:



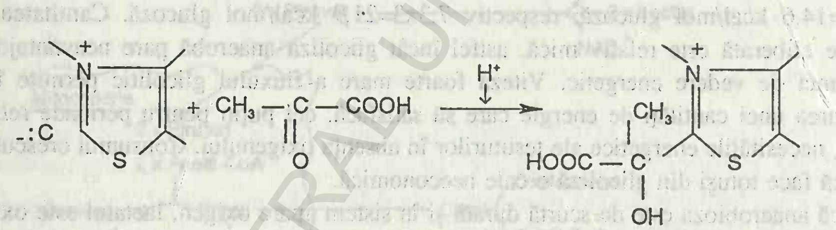
– E_3 - lipoil dehidrogenaza, având ca grupare prostetică FAD.

– kinaza AMP_c independentă:

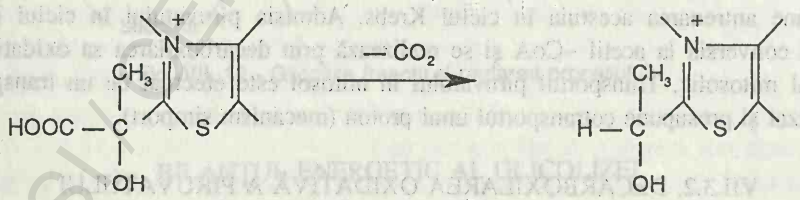
– fosfatază specifică, dependentă de Ca^{2+} şi Mg^{2+}, asociată, tranzitoriu, complexului.

Aceste enzime alcătuiesc un sistem multienzimatic, cu un aranjament spaţial rigid, care poartă numele de complexul piruvat dehidrogenază. Structural şi funcţional diferite, fără să fie legate covalent, enzimele componente catalizează etapele succesive ce duc la obţinerea acetil ~CoA din piruvat. Complexul are o masă moleculară de aproximativ 5×10^3 kD şi conţine un foarte mare număr de copii din fiecare enzimă.

Decarboxilarea piruvatului necesită adiţia TPP la piruvat - adiţie efectuată ca urmare a unui atac nucleofil realizat de ionul ilidă, formă ionizată a nucleului tiazolic al TPP, asupra carbonului carbonilic pozitivat din molecula piruvatului:



Compusul de adiţie se decarboxilează cu formarea acetaldehidei active:

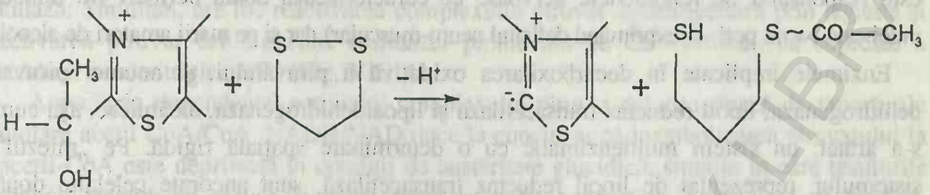


Reacţia este catalizată de subunitatea α a E_1.

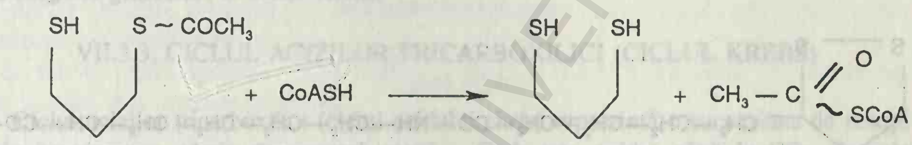
Urmează etapa de oxidare propriu-zisă, constând în pierderea hidrogenului şi transformarea acetaldehidei în radical acetil. Reacţia este catalizată de subunitatea β a piruvat dehidrogenazei (E_1). Cum reacţia se desfăşoară în prezenţa acidului lipoic, se

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

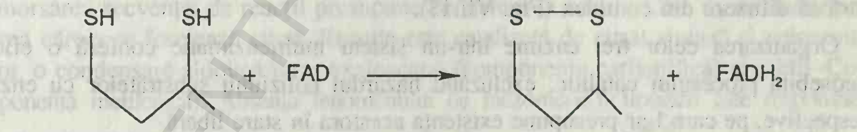
formează acid acetil-lipoic. De remarcat faptul că energia eliberată prin oxidare se regăseşte în tioesterii care se formează (acetil ~ lipoic şi apoi acetil ~CoA).



Radicalul acetil, temporar legat la acidul lipoic, este transferat coenzimei A cu formarea acetil-CoA-tioester macroergic:



Acidul lipoic astfel redus se reoxidează în prezenţa lipoat dehidrogenazei, flavin enzimă ce transferă hidrogenul acidului lipoic pe FAD.



Atomii de hidrogen din $FADH_2$ sunt apoi transferaţi pe NAD.

Reacţia globală a decarboxilării oxidative a piruvatului:

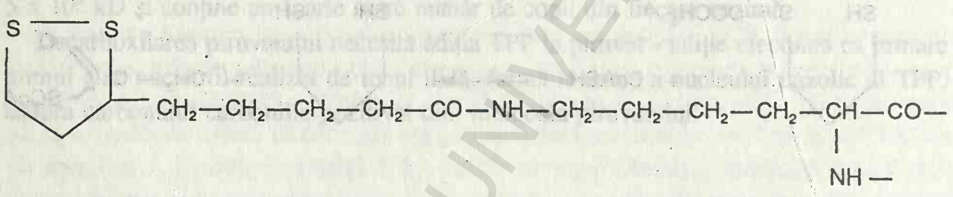
$$CH_3COCOOH + NAD^+ + CoASH \longrightarrow CH_3CO\sim SCoA + NADH + H^+ + CO_2$$

este o reacţie ireversibilă având un ΔG^o foarte negativ (-8 kcal). Ireversibilitatea acestei reacţii constituie motivul pentru care acizii graşi cu număr par de atomi de carbon sau diverşi aminoacizi ce formează prin degradare acetil ~CoA nu sunt glucoformatori (vezi gluconeogeneza).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De menţionat că în avitaminoza B_1 decarboxilarea oxidativă a piruvatului nu se poate realiza prin lipsa TPP, ceea ce are grave repercusiuni asupra creierului care se află în situaţia de a nu putea folosi aerob-glucoza. Deficitul sistemului piruvat dehidrogenazic este responsabil de fenomenele nervoase ce caracterizează boala beriberi (în dialect indonezian = nu pot! — exprimând deficitul neuro-muscular) dar şi pe marii amatori de alcool.

Enzimele implicate în decarboxilarea oxidativă a piruvatului, şi anume: piruvat dehidrogenaza, lipoil reductaz transacetilaza şi lipoatdehidrogenaza, alcătuiesc, aşa cum s-a arătat, un sistem multienzimatic cu o determinare spaţială rigidă. Pe „miezul" sistemului, reprezentat de lipoil reductaz transacetilază, sunt ancorate celelalte două enzime. Transformarea substratelor presupune ca acestea să fie purtate succesiv la enzimele sistemului. Într-adevăr, operaţiunea este realizată de către acidul lipoic legat la radicalul lizil din molecula lipoil reductaz transacetilazei care realizează astfel un „braţ" flexibil de aproximativ 1,4 nm:



Acest „braţ" încărcat efectuează o mişcare de „du-te vino" între grupările prostetice ale sistemului multienzimatic în cursul căreia fiecare enzimă îşi realizează acţiunea, produsul unei reacţii enzimatic catalizate devenind substrat pentru următoarea enzimă, fără să difuzeze din complex (Fig. VII.13).

Organizarea celor trei enzime într-un sistem multienzimatic conferă o eficienţă deosebită procesului catalitic, excluzând hazardul coliziunii substratelor cu enzimele respective, pe care l-ar presupune existenţa acestora în stare liberă.

Cercetări recente au evidenţiat faptul că la mamifere sistemul piruvat dehidrogenază este sediul unui control metabolic riguros realizat atât prin efectori alosterici cât şi prin modificare covalentă, respectiv prin trecerea reversibilă a formei fosfo în defosfo. Conversia defosfo-piruvat dehidrogenazei la fosfo-piruvat dehidrogenază se realizează în prezenţa unei kinaze, AMP_c independentă, parte integrantă a complexului multienzimatic, şi coincide cu inactivarea enzimei, în timp ce conversia fosfo-piruvat dehidrogenazei la defosfo -enzimă este catalizată de o fosfatază specifică şi duce la activarea enzimei.

Forma activă, defosfo, a complexului piruvat dehidrogenază este inhibată alosteric de produşii acţiunii sale, acetil ~CoA şi NADH care sunt în acelaşi timp şi activatori

alosterici, ca şi ATP, ai piruvat dehidrogenaz-kinazei, enzimă ce fosforilează subunitatea $E_{1\alpha}$ a piruvat dehidrogenazei, inhibând-o.

Spre deosebire de acetil CoA şi NADH, piruvatul, ca şi CoA şi NAD, substrate ale complexului multienzimatic, inactivează, la concentraţii mari, piruvat dehidrogenaz-kinaza. Simultan, are loc reactivarea complexului piruvat dehidrogenază prin legarea şi activarea piruvat dehidrogenaz fosfatazei promovată de Ca^{2+} crescut, ca expresie a scăderii concentraţiei ATP (Fig. VII.14).

Aprecierea dependenţei activităţii complexului piruvat dehidrogenază de raporturile molare acetil CoA/CoA, NADH/NAD duce la concluzia că metabolizarea piruvatului la acetil-CoA este deprimată în condiţii de austeritate glucidică, situaţie în care ţesuturile glucoindependente recurg la acizii graşi ca sursă energetică; acetil-CoA şi NADH, rezultate prin β oxidarea acizilor graşi, inactivează complexul piruvat dehidrogenază făcând imposibilă utilizarea energetică a piruvatului (provenit, în speţă, din lactat şi alanină) care se va orienta spre gluconeogeneză.

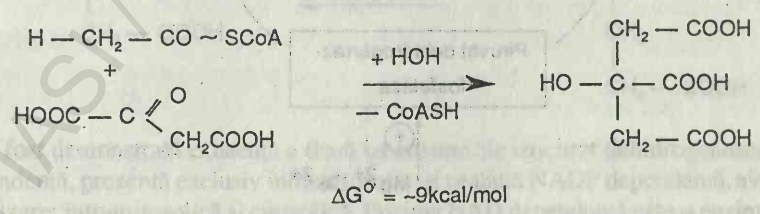
În faza anabolică, activitatea complexului piruvat dehidrogenază este crescută când necesităţile energetice crescute impun antrenarea unor cantităţi mai mari de acetil-CoA, de sorginte glucidică, în ciclul Krebs.

VII.3.3. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI (CICLUL KREBS)

Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul acidului citric) reprezintă o succesiune de reacţii prin parcurgerea căreia fragmentul acetil ~ CoA este oxidat până la CO_2. Etapele ciclului au fost postulate şi demonstrate ulterior de către Hans Krebs care, cu câţiva ani înainte, elucidase etapele procesului de ureogeneză.

Introducerea fragmentului acetil~CoA în ciclul Krebs se realizează prin condensarea sa cu oxaloacetatul. Parcurgerea acestui ciclu, urmată de oxidarea hidrogenului în lanţul respirator, se soldează cu oxidarea totală a acetil~CoA (în cursul căreia se formează 12 moli ATP/mol acetil-CoA) şi regenerarea oxaloacetatului.

Amorsarea secvenţei de reacţii presupune condensarea acetil~ CoA cu oxaloacetatul în urma căreia se formează citrat. Reacţia este catalizată de citrat sintază şi reprezintă, în fapt, o condensare aldolică între oxaloacetat (componenta carbonilică) şi acetil~CoA (componenta metilenică). Absenţa fenomenului de mezomerie în tioesteri este responsabilă de efectul atrăgător de electroni al grupei >CO din gruparea $-C(=O)SCoA$ având ca rezultat labilizarea hidrogenului din poziţia α.



$\Delta G^{o} = -9 kcal/mol$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

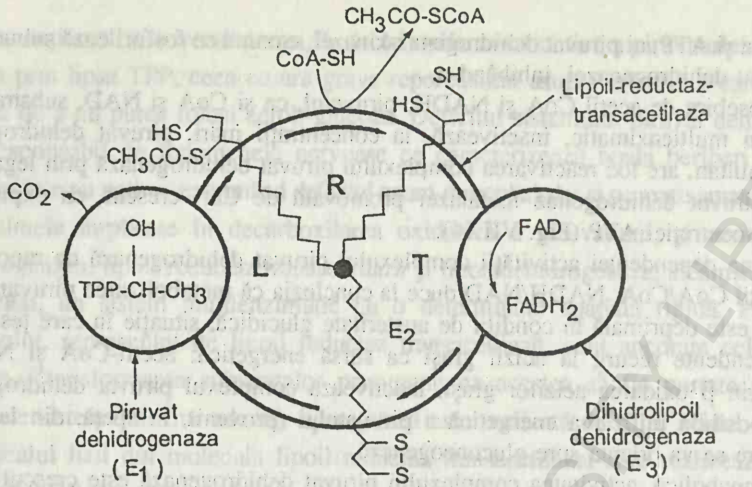


Fig. VII. 13 - Organizarea complexului piruvat dehidrogenază

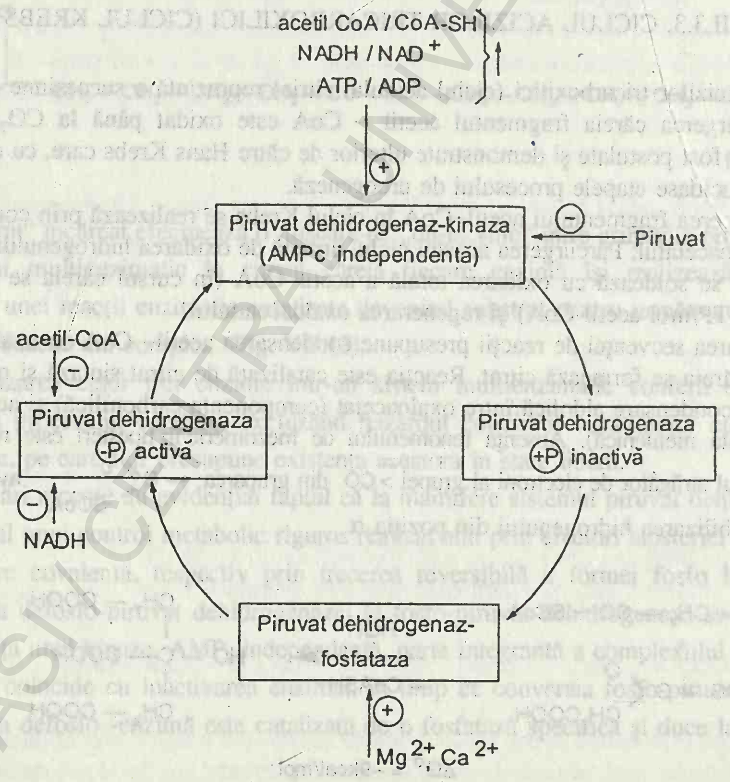
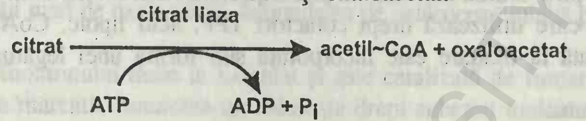


Fig. VII.14 - Controlul modificării covalente şi alosterice a activităţii complexului piruvat dehidrogenază

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

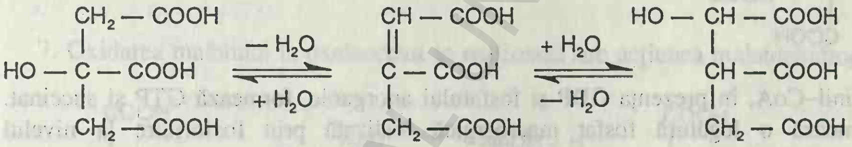
Citrat sintaza este o enzimă alosterică inhibată de ATP, NADH, citrat, acizi graşi cu lanţ lung, ca şi de succinil~CoA, intermediar al ciclului Krebs. Scăderea afinităţii citrat sintazei pentru acetil~CoA la concentraţii mari de ATP permite ciclului Krebs să-şi adapteze ritmul la necesităţile energetice ale ţesuturilor.

De remarcat că în ficat şi alte ţesuturi care fac neolipogeneză, formarea citratului reprezintă o răspântie metabolică extrem de importantă în care se hotărăşte soarta acetatului activ. Acesta se poate angaja nu numai în etapele ulterioare ale ciclului Krebs ci şi în biosinteza de novo a acizilor graşi, care are loc în citosol. Întrucât acetil-CoA format în mitosol din piruvat nu poate traversa membrana mitosolică, strategia adoptată de celulă constă în exportul său sub formă de citrat, prin intermediul unui transportor specializat, urmată de clivarea la acetil~CoA şi oxaloacetat:



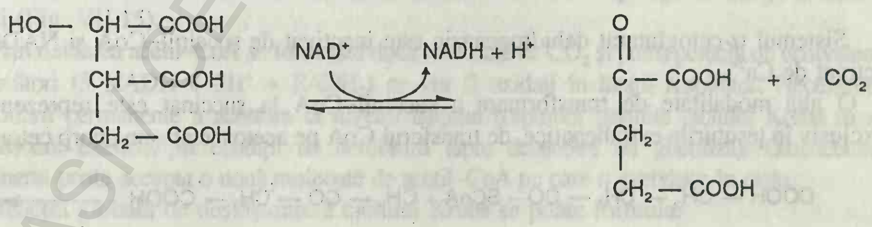
Ieşirea citratului din mitosol, în vederea angajării sale în neolipogeneză, are loc exclusiv în condiţiile în care evoluţia sa în ciclul Krebs este blocată prin cantităţile mari de ATP şi NADH, rezultate prin metabolizarea glucozei, care sunt inhibitori ai enzimei limitante de viteză (vezi mai jos).

2. Într-o etapă ulterioară, citratul este izomerizat la izocitrat prin intermediul acidului cis-aconitic sub acţiunea aconitazei:



Echilibrul care se stabileşte între cele trei forme depinde de viteza de oxidare a acidului izocitric sub acţiunea izocitrat dehidrogenazei. Trecerea acidului citric în acid izocitric este inhibată de acidul fluoracetic.

3. Sub acţiunea izocitrat dehidrogenazei, izocitratul suferă o oxidare însoţită de decarboxilare, formând α-cetoglutarat



A fost demonstrată existenţa a două izoenzime ale izocitrat dehidrogenazei: una NAD dependentă, prezentă exclusiv intramitosolic, şi cealaltă NADP dependentă, având o dublă localizare: intramitosolică şi citosolică. Enzima NAD dependentă este o enzimă alosterică având ca efector pozitiv ADP, ceea ce sugerează că ea este forma implicată în desfăşurarea ciclului Krebs, cale catabolică având ca scop sinteza de ATP. Activarea

enzimei prin ADP antrenează faptul că, ori de câte ori concentraţia ADP este mare, enzima îşi măreşte semnificativ activitatea. Simultan, activitatea întregului ciclu creşte, etapa catalizată de izocitrat dehidrogenază fiind etapa limitantă de viteză. Enzima este inhibată alosteric şi de către NADH.

Izocitrat dehidrogenaza NADP dependentă este, dimpotrivă, inhibată de ADP şi stimulată de ATP. Cum enzima este activă în condiţii ce favorizează sintezele (ATP crescut), s-a conchis că enzima este implicată, alături de enzima malică şi dehidrogenazele şuntului pentozelor, în furnizarea NADPH necesar sintezelor reductive ce se desfăşoară esenţial în citosol.

4. Decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului la succinat are loc similar cu decarboxilarea piruvatului. Ea necesită prezenţa sistemului multienzimatic α-cetoglutarat dehidrogenază care utilizează drept cofactori TPP, acid lipoic, CoASH, NAD, FAD. Energia eliberată la oxidare este încorporată sub forma unei legături tiol esterice în succinil~CoA:

$$COOH-CO-CH_2-CH_2-COOH + NAD^+ + CoASH \xrightarrow{-CO_2} COOH-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA + NADH + H^+$$

Succinil~CoA, în prezenţa GDP şi fosfatului anorganic, formează GTP şi succinat. Se formează o legătură fosfat macroergică realizată prin fosforilare la nivelul substratului.

Reacţia este catalizată de succinil tiokinaza (succinil CoA sintetaza).

$$\begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2-CO\sim SCoA \end{array} + GDP + PO_4H_3 \rightleftharpoons \begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2-COOH \end{array} + CoASH + GTP$$

Sistemul α-cetoglutarat dehidrogenazic este inactivat de succinil~CoA şi NADH şi activat de Ca^{2+}.

O altă modalitate de transformare a succinil~CoA la succinat este reprezentată, exclusiv în ţesuturile extrahepatice, de transferul CoA pe acetoacetat - un „corp cetonic":

$$COOH-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA + CH_3-CO-CH_2-COOH \longrightarrow$$

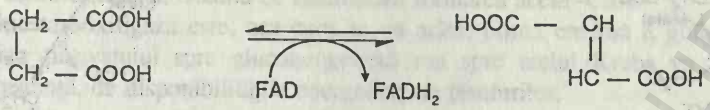
$$COOH-CH_2-CH_2-COOH + CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA$$

Reacţia permite metabolizarea ulterioară a acetoacetatului sub formă de acetoacetil~CoA. Reacţia este catalizată de succinil CoA - acetoacetat tioforaza (vezi cetogeneza).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

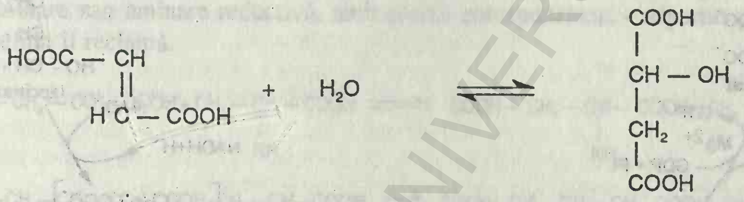
α-Cetoglutarat dehidrogenaza este, ca şi piruvat dehidrogenaza, inhibată de produşii reacţiei enzimatice; succinil-CoA şi NADH. De asemenea, enzima este sensibilă la încărcarea energetică a celulei, fiind inhibată de ATP şi activată de Ca^{2+}.

5. Oxidarea succinatului la fumarat se realizează prin acţiunea succinat-dehidrogenazei, enzimă a lanţului respirator având drept coenzimă FAD:

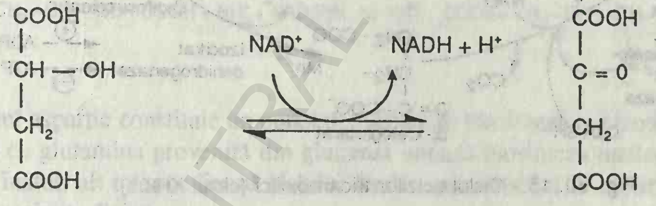


Oxidarea succinatului la fumarat este inhibată competitiv de malonat, un fals substrat, ca şi de concentraţii mari de oxaloacetat. Acumularea de oxaloacetat inhibă propria-i formare din succinat.

6. Hidratarea fumaratului duce la L-malat şi este catalizată de fumarază; enzimă cu stereospecificitate marcată, fumaraza nu foloseşte drept substrat maleatul:



7. Oxidarea malatului la oxaloacetat se realizează sub acţiunea malatdehidrogenazei:



Derularea ciclului Krebs duce deci la oxidarea acetil ~ CoA şi regenerarea oxaloacetatului (Fig. VII.15).

Prin oxidarea acetil~CoA se formează două molecule de CO_2 şi patru perechi de echivalenţi reducători (3 NADH + $3H^+$ + $FADH_2$) ce vor fi oxidaţi în lanţul respirator. Necesitatea reoxidării permanente a acestora la nivelul lanţului respirator permite ciclului Krebs să se desfăşoare exclusiv în condiţii de aerobioză (spre deosebire de glicoliză). Oxalacetatul regenerat poate accepta o nouă moleculă de acetil~CoA pe care o introduce în ciclu.

Reacţia globală de desfăşurare a ciclului Krebs se poate formula:

$$CH_3CO\text{~}SCoA + 3\,NAD^+ + FAD + GDP + 2H_2O + P_i \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH + FADH_2 + GTP + 2H^+ + CoASH$$

Ciclul Krebs constituie o cale finală de degradare, comună glucidelor, lipidelor, proteinelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

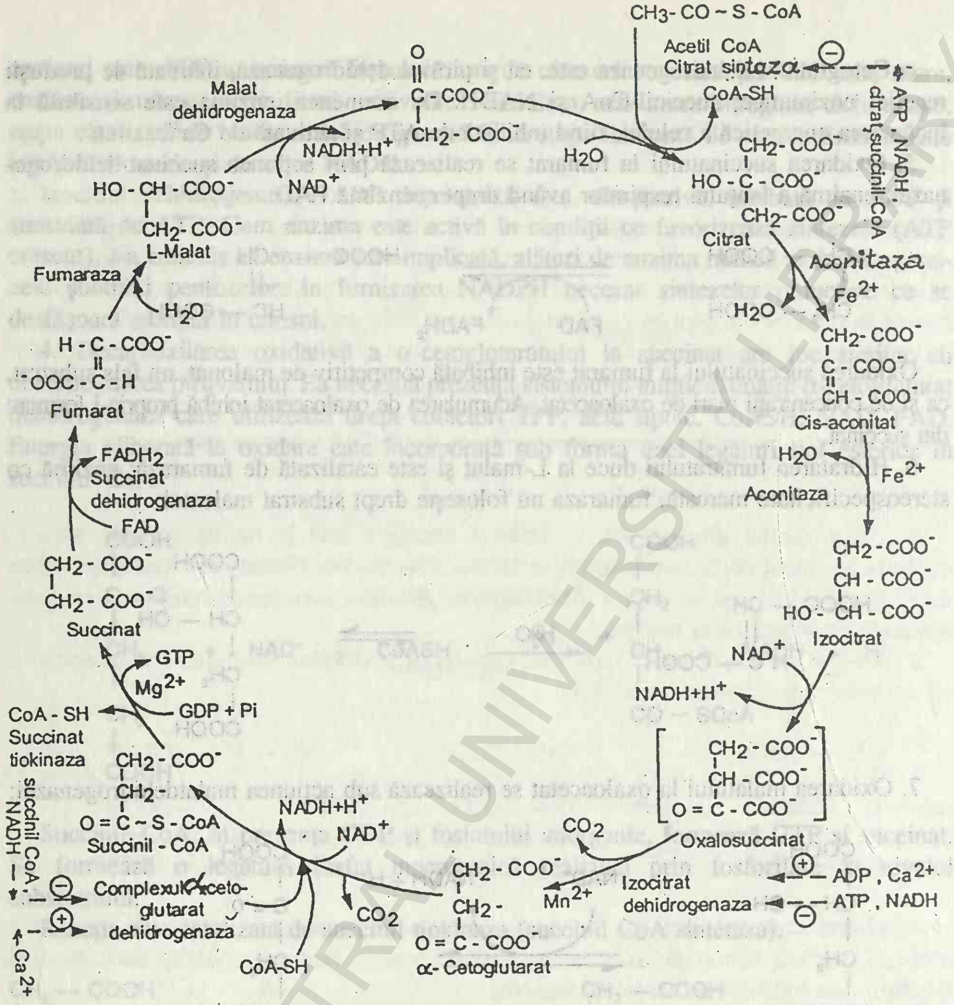


Fig. VII. 15 - Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)

Acizii graşi intră în ciclul Krebs prin componenta acetil~CoA, produs al β-oxidării.

Aminoacizii glucoformatori (glutamat, aspartat, arginină, prolină, histidină, valină, metionină, serină, glicocol, treonină, cisteină, tirozină, fenilalanină) se catabolizează pe căi proprii dând naştere la intermediari ai ciclului Krebs. Aminoacizii cetoformatori (leucină, fenilalanină) generează acetil~CoA (vezi metabolismul aminoacizilor).

De remarcat că acizii graşi, ca şi aminoacizii cetoformatori, pot furniza exclusiv componenta acetil~CoA. Spre deosebire de aceştia, unii aminoacizi, dar mai ales glucidele, pot forma nu numai componenta acetil-CoA (prin piruvat) care se consumă, ci şi componenta oxaloacetat care permite amorsarea ciclului Krebs. Reacţia de formare a oxaloacetatului condiţionează, evident, utilizarea grăsimilor. Formarea oxaloacetatului are loc esenţial prin carboxilarea piruvatului sub acţiunea piruvat carboxiligazei, enzimă localizată intramitosolic care necesită biotina drept grupare prostetică:

$$CH_3COCOOH + CO_2 + ATP \longrightarrow COOH - CH_2 - CO - COOH + ADP + P_i$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Piruvat carboxiligaza este o enzimă alosterică a cărei activitate depinde de prezenţa acetil~CoA – efector pozitiv al enzimei; în absenţa acestuia enzima este complet inactivă. Creşterea concentraţiei acetil~CoA va induce creşterea activităţii piruvat carboxiligazei, favorizând astfel intrarea restului acetil în ciclul de oxidare, prin cuplare cu oxaloacetatul. Diminuarea concentraţiei de acetil~CoA favorizează activitatea piruvat dehidrogenazei, enzimă ce catalizează formarea acetil~CoA.

Piruvat carboxiligaza este, aşa cum se va arăta, prima enzimă a gluconeogenezei. Orientarea piruvatului spre gluconeogeneză sau spre ciclul Krebs va fi decisă, în ultimă instanţă, de disponibilităţile energetice ale ţesuturilor.

CICLUL KREBS - CALE AMFIBOLICĂ

Pe lângă faptul că reprezintă o cale de degradare comună pentru glucide, lipide şi proteine, ciclul Krebs poate furniza intermediarii săi diverselor procese metabolice. Astfel, oxaloacetatul şi α - cetoglutaratul, cei doi cetoacizi ai ciclului, pot forma, prin transaminare sau aminare reductivă, aminoacizii corespunzători - aspartic şi glutamic, dacă celula îi reclamă.

$$COOH-CH_2-CO-COOH + CH_3-CH(NH_2)-COOH \rightleftharpoons COOH-CH_2-CH(NH_2)-COOH + CH_3-C(=O)-COOH$$

$$COOH-CH_2-CH_2-CO-COOH + CH_3-CH(NH_2)-COOH \rightleftharpoons COOH-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH + CH_3-C(=O)-COOH$$

$$COOH-CH_2-CH_2-CO-COOH + NH_4^+ + NAD(P)H \rightleftharpoons COOH-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH + NADP^+ + H_2O$$

Acidul aspartic constituie un punct de plecare în biosinteza nucleotidelor pirimidinice în timp ce glutamina provenită din glutamat iniţiază biosinteza nucleotidelor purinice.

Succinatul, alt intermediar al ciclului Krebs, este antrenat în biosinteza hemului prin ciclul succinat-glicină.

Citratul, reprezintă forma de transport a acetil ~ CoA din mitosol în citosol; acetil~CoA citosolic este antrenat în sinteza de novo a acizilor graşi sau a colesterolului:

$$HO-C(COOH)(CH_2-COOH)_2 + CoASH \xrightarrow[ATP \rightarrow ADP+P_i]{\text{citrat liaza}} CH_2(COOH)-CO-COOH + CH_3CO{\sim}SCoA$$

Oxaloacetatul, transportat din mitosol în citosol ca malat, este convertit la fosfoenolpiruvat care se angajează în gluconeogeneză.

Aspartatul, glutamatul, porfirinele, glucoza, pirimidinele, acizii graşi îşi construiesc scheletul hidrocarbonat pe seama intermediarilor ciclului Krebs.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Funcţionarea ciclului Krebs, pe de o parte drept cale catabolică iar pe de altă parte drept cale de iniţiere anabolică, îl consacră drept cale amfibolică (anabolică şi catabolică). Relaţiile intermetabolice ale ciclului Krebs sunt redate In Fig. VII. 16.

Utilizarea în diferite procese biosintetice a intermediarilor ciclului Krebs necesită, evident, mecanisme complementare ce permit refacerea acestora. Reacţiile care permit furnizarea intermediarilor ciclului Krebs poartă numele de reacţii anaplerotice. (ana = din nou; pliro = a umple, a completa).

Necesitatea „reumplerii" cu substrate decurge din caracterul endergonic al reacţiilor biosintetice a căror desfăşurare se asigură prin funcţia catabolică a ciclului Krebs.

Reacţia anaplerotică cea mai importantă este cea de carboxilare a piruvatului la oxaloacetat (vezi mai sus). Scăderea concentraţiei oricăruia dintre intermediarii ciclului Krebs se traduce prin acumulare de acetil-CoA, „percepută" de către piruvat carboxiligază care, activându-se, produce oxaloacetat. Acesta va fi utilizat în reacţiile de sinteză sau va creşte viteza de desfăşurare a ciclului Krebs (dacă nu este suprasaturat).

În fază catabolică, enzimele cheie ale ciclului Krebs sunt inhibate la concentraţii mari de NADH, provenit prin β oxidarea acizilor graşi. În această situaţie, oxaloacetatul se reduce la malat şi iese în citosol unde va fi utilizat în gluconeogeneză.

Reacţii anaplerotice sunt considerate şi căile de degradare a acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon şi a unor aminoacizi (izoleucină, valină, metionină), soldate cu formarea succinil-CoA.

Oxidarea glutamatului la α-cetoglutarat este, de asemenea, o reacţie anaplerotică.

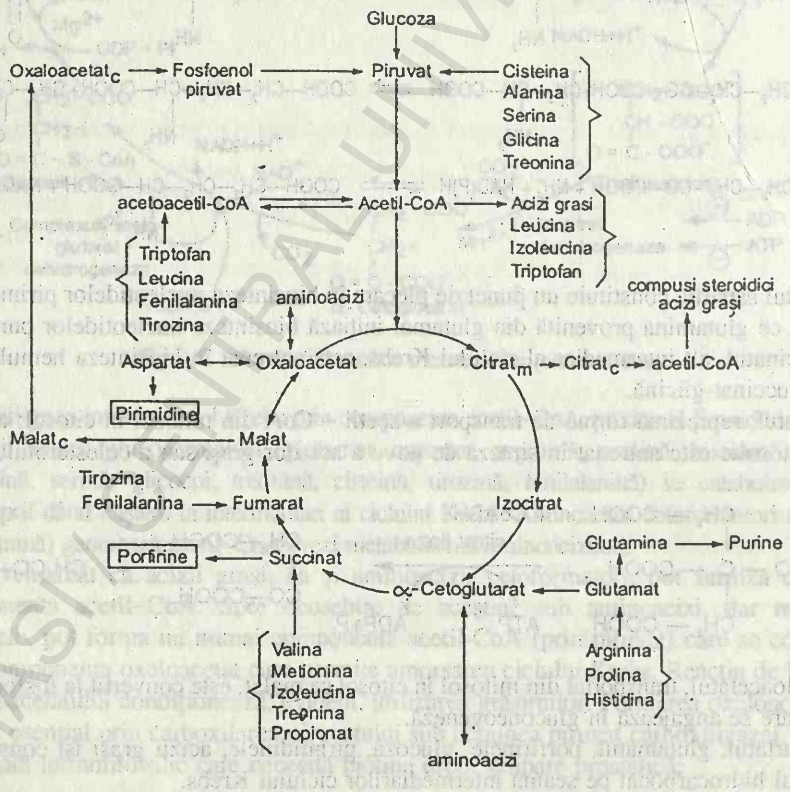


Fig. VII. 16 - Ciclul Krebs - cale amfibolică
(m = mitosol; c = citosol)

BILANŢUL ENERGETIC AL ARDERII GLUCOZEI

În succesiunea de reacţii ce reprezintă ciclul Krebs, semnificative din punct de vedere energetic sunt reacţiile de oxidare. În ciclul Krebs, reacţiile de oxidare se soldează cu formarea de echivalenţi reducători: NADH, $FADH_2$. Oxidarea coenzimelor reduse are loc la nivelul lanţului respirator, proces în cursul căruia, prin cuplarea oxidării cu fosforilarea, este generat ATP, monedă „forte“ a metabolismului energetic. Cuplarea reacţiilor ciclului Krebs cu lanţul respirator este posibilă graţie localizării intramitosolice şi vecinătăţii spaţiale a sistemelor enzimatice implicate în cele două procese. Oxidarea NADH duce, aşa cum s-a arătat, la formarea a 3 moli ATP, în timp ce oxidarea $FADH_2$ dă naştere la 2 moli de ATP.

Pentru stabilirea bilanţului energetic al oxidării piruvatului, vom urmări etapele oxidative şi bilanţul lor energetic.

Etapele catalizate de dehidrogenaze NAD dependente, care se soldează cu formarea NADH, deci a câte 3 moli ATP, sunt:

– decarboxilarea oxidativă a piruvatului în prezenţa piruvat dehidrogenazei → NADH = 3 ATP;

– dehidrogenarea izocitratului în prezenţa izocitrat dehidrogenazei NAD dependente → NADH = 3 ATP;

– decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului în prezenţa α-cetoglutarat dehidrogenazei → NADH = 3 ATP;

- dehidrogenarea malatului în prezenţa malat dehidrogenazei → NADH = 3 ATP.

Etapa de oxidare a succinatului la fumarat se face în prezenţa FAD şi duce la 2 moli ATP.

În afara etapelor oxidative, care reclamă cuplarea acestora cu catena de oxidaţie celulară în vederea formării ATP, există în ciclul Krebs o etapă care sintetizează ATP la nivelul substratului şi anume etapa conversiei succinil~CoA (obţinut prin decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului) la succinat.

Însumând numărul de moli de ATP rezultaţi prin oxidarea unui mol de piruvat în ciclul Krebs, cuplat cu catena de oxidaţie celulară, se obţine un total de 15 moli ATP. Oxidarea unui mol de acetil-CoA furnizează 12 moli ATP.

Ţinând seama că trei sferturi până la nouă zecimi din glucoză parcurge, în vederea oxidării, calea Embden-Meyerhof şi apoi ciclul Krebs cuplat cu lanţul respirator, bilanţul energetic al oxidării totale a unei molecule de glucoză trebuie să ia în consideraţie şi etapele până la formarea piruvatului. În condiţii de aerobioză, NADH rezultat în etapa catalizată de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază se oxidează la nivelul lanţului respirator generând fie 3 moli, fie 2 moli ATP pentru fiecare mol de gliceraldehidă, funcţie de sistemul navetă utilizat. Cum naveta malat îşi revendică universalitatea, se poate aprecia că pentru fiecare mol de glucoză oxidată total se formează în această etapă 6 moli ATP.

În calea Embden-Meyerhof există două etape în care ATP se obţine prin fosforilare la nivelul substratului: etapa conversiei 1,3-bisfosfogliceratului la 3-fosfoglicerat şi cea a conversiei fosfoenolpiruvatului la piruvat. Prin fosforilare la nivelul substratului rezultă în total 4 moli ATP.

Numărul total de moli ATP formaţi prin oxidarea glucozei la piruvat este deci 10. Cum însă 2 moli se consumă în reacţiile catalizate de kinaze,

$$\text{glucoză} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{glucozo-6-fosfat}$$

$$\text{fructozo-6-P} \xrightarrow{\text{ATP}} \text{fructozo-1,6-bisfosfat}$$

câştigul net este de 8 moli ATP.

Oxidarea celor 2 moli de piruvat rezultaţi în calea Embden-Meyerhof furnizează 30 moli ATP, deci bilanţul oxidării complete a unui mol de glucoză până la CO_2 şi apă este de 38 moli ATP. Considerând că $\Delta G^{o'}$ de hidroliză a legăturii fosfat terminale din molecula ATP este de - 7,3 kcal/mol, prin oxidarea glucozei în condiţii de aerobioză se eliberează 38 x 7,3 = 277 kcal/mol glucoză. Ţinând seama că oxidarea glucozei în condiţii standard ($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$) generează 686 kcal/mol se poate conchide că randamentul de utilizare a energiei libere mobilizată în acest proces este de 40% (276/686 x 100). Eficienţa energetică a degradării oxidative complete a glucozei este superioară glicolizei, aşa cum rezultă din compararea ecuaţiilor globale a celor două procese:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ P_i \longrightarrow 2\ lactat + 2\ ATP + 2\ H_2O + 2\ H^+$$

$$C_6H_{12}O_6 + 38\ ADP + 38\ P_i + 6O_2 \longrightarrow 38\ ATP + 6\ CO_2 + 44\ H_2O.$$

Pentru obţinerea a 38 moli ATP este necesar ca 19 moli de glucoză să se angajeze, în condiţii de anaerobioză, în degradarea până la lactat.

Trecerea de la anaerobioză la aerobioză creşte cantitatea de ATP, pe seama ADP, ceea ce antrenează scăderea vitezei lanţului respirator (vezi controlul prin acceptor de fosfat) şi deci a raportului NAD/NADH. Enzimele cheie ale ciclului Krebs, ca şi cele ale glicolizei (FF-1K este inhibată de ATP şi citrat) îşi reduc activitatea, viteza glicolizei scăzând dramatic în cursul comutării anaerobioză - aerobioză.

În celulele canceroase viteza glicolizei depăşeşte posibilităţile de utilizare a piruvatului în ciclul Krebs, motiv pentru care, chiar în condiţii de aerobioză piruvatul trece în lactat. Pierderea relaţiei reglatorii a celor două căi, caracteristică şi altor procese interdependente, în cancer, alături de consumul foarte mare de ATP, propriu proceselor tumorale (antrenând activarea FF-1-K), sunt considerate explicaţii posibile pentru viteza fulminantă a glicolizei în această situaţie.

VII.4. ALTE CĂI DE METABOLIZARE A GLUCOZEI

VII.4.1. CALEA PENTOZO - FOSFAŢILOR (ŞUNTUL PENTOZO - FOSFAT)

O importantă posibilitate de evoluţie metabolică a glucozo-6-fosfatului o reprezintă calea pentozo-fosfaţilor. Raţiunea biologică a acestei căi, în care etapele oxidative sunt catalizate de dehidrogenaze NADP dependente, este, în primul rând, producerea NADPH necesar tuturor biosintezelor reductive (spre deosebire de NADH care este oxidat în vederea obţinerii de ATP). Cum calea pentozo-fosfat se desfăşoară în citosol, consumatorul nemijlocit şi cantitativ major al NADPH îl reprezintă biosinteza acizilor graşi, proces citosolic.

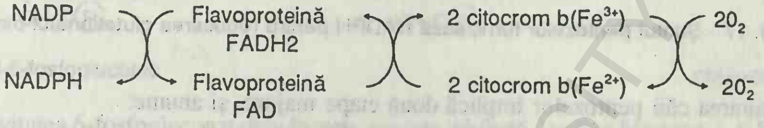
Biosinteza colesterolului, a hormonilor steroizi, ca şi hidroxilarea unor compuşi străini organismului, ca primă etapă în metabolizarea acestora, necesită echivalenţi reducători tot sub forma NADPH.

Importanţa căii pentozelor ca furnizor major de echivalenţi reducători necesari biosintezelor reductive este sprijinită de faptul că viteza acesteia este maximă în ţesuturi

în care lipogeneza şi sinteza de hormoni steroizi sunt deosebit de intense, respectiv ţesutul adipos, glanda mamară în lactaţie, ficat, corticosuprarenală.

NADPH este, de asemenea, necesar activităţii bactericide a granulocitelor şi macrofagelor care folosesc ca „arme chimice“ speciile reactive de oxigen (anionul superoxid O_2^- ; apa oxigenată, radicalul hidroxil $^{\cdot}OH$).

Este demonstrat faptul că declanşarea fagocitozei este precedată de creşterea consumului de oxigen, neinhibat de cianuri, şi de glucoză în granulocit. NADPH, rezultat prin oxidarea glucozei în şuntul pentozelor, reduce O_2 la O_2^- într-o reacţie catalizată de complexul enzimatic NADPH - oxidază situat în membrana plasmatică.:



Localizarea sistemului generator de O_2^- pe suprafaţa externă a membranei granulocitului, membrană care prin invaginare creează peretele intern al fagozomului, permite atacul direct al O_2^- şi al speciilor reactive generate de acesta asupra bacteriei ingerate. Deşi O_2^- nu este un oxidant puternic, el evoluează în vacuola fagocitară spre specii mai reactive: H_2O_2 şi $^{\cdot}OH$, format în prezenţa catalitică a Fe^{2+}, nelegat la proteine, în reacţia Haber - Weiss:

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{Fe^{2+}} {}^{\cdot}OH + {}^{-}OH + O_2$$

Aceste specii reactive de oxigen produc oxidarea unor componente esenţiale pentru structura şi funcţia bacteriei, ca de exemplu acizii graşi din structura membranelor; peroxizii lipidici formaţi (ROOH) se descompun formând compuşi citotoxici, în speţă aldehide, cum ar fi 4 hidroxi nonenalul şi malondialdehida, care contribuie la acţiunea bacteriolitică şi bactericidă a fagocitului.

Protecţia granulocitului însuşi împotriva acestor specii distructive este necesară şi posibilă, întrucât acesta este înzestrat cu mecanisme de detoxifiere a radicalilor liberi.

Pentru regenerarea GSH consumat în reacţia glutation peroxidazică (GSH-Px), de descompunere a apei oxigenate ($2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow[\text{peroxidază}]{\text{glutation}} GSSG + 2H_2O$), se face apel la şuntul pentozelor care furnizează NADPH necesar reacţiei glutation reductazice (GSSG-R) (Fig. VII.17).

Implicarea şuntului pentozelor atât în iniţierea etapelor oxidative ale fagocitozei cât şi în limitarea proceselor distructive la care se expune fagocitul subliniază importanţa acestei căi metabolice în reacţiile de apărare a organismului.

Se consideră că O_2^- produs în reacţia NADPH oxidazică participă şi la acţiunile antivirale şi antitumorale ale unor celule specializate.

Pe lângă producerea NADPH, importanţa căii pentozelor constă şi în furnizarea de pentoze necesare biosintezei nucleotidelor şi acizilor nucleici.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

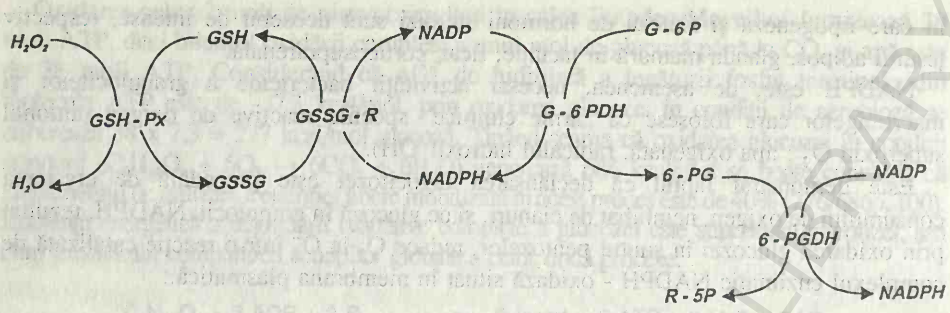
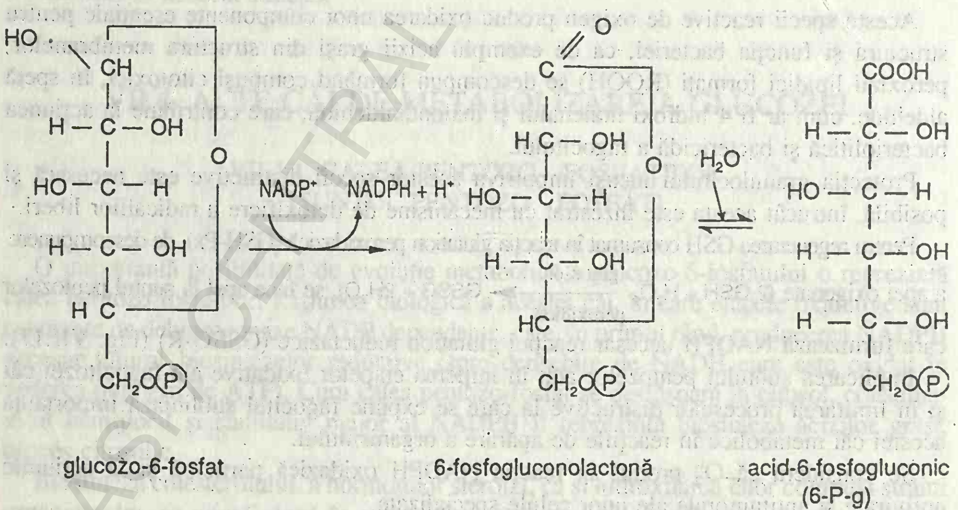


Fig. VII. 17 - Şuntul pentozelor furnizează NADPH pentru reducerea glutationului oxidat

Desfăşurarea căii pentozelor implică două etape majore, şi anume:

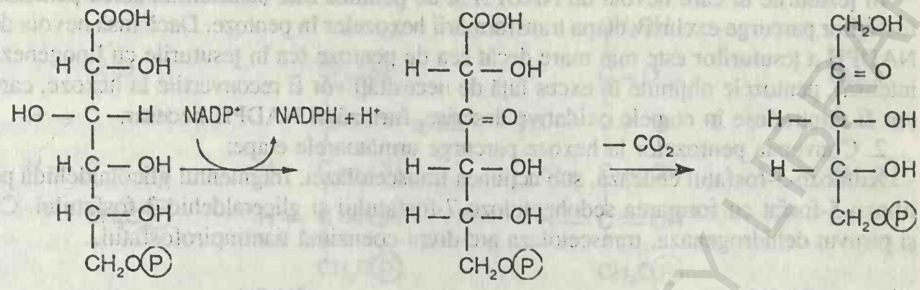
1. conversia hexozelor la pentoze (etapa oxidativă);
2. conversia pentozelor la hexoze.

1. Conversia hexozelor la pentoze este iniţiată de oxidarea NADP dependentă a glucozo-6-fosfatului la 6-fosfogluconat în prezenţa glucozo-6-fosfat dehidrogenazei; intermediar se formează 6-fosfogluconolactona care, sub acţiunea δ-lactonazei, este hidrolizată la acidul corespunzător. De menţionat specificitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei pentru anomerul β:



Într-o etapă ulterioară are loc oxidarea 6-fosfogluconatului la acid 3-ceto-6-fosfogluconic, care este decarboxilat simultan la ribulozo-5-fosfat. Enzima care catalizează această etapă,

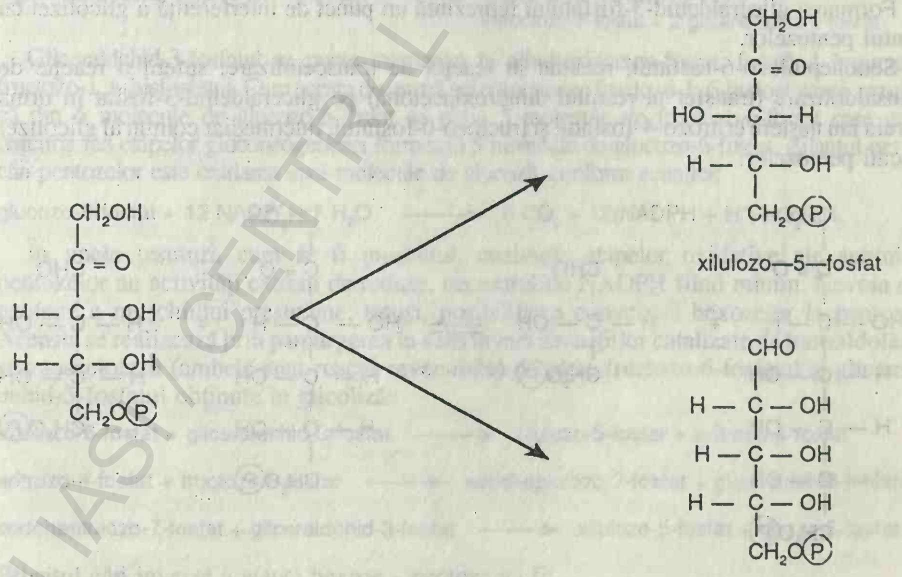
6-fosfogluconat dehidrogenaza NADP dependentă, realizează deci oxidarea decarboxilantă a substratului său:



acid-6-fosfogluconic   ribulozo-5-fosfat

Activitatea 6-fosfogluconat dehidrogenazei este inhibată de către fructozo-1, 6-bisfosfat, substrat al glicolizei. Creşterea concentraţiei acestuia va produce o relativă blocare a şuntului în această etapă, astfel încât conversia ulterioară a pentozelor la hexoze, eventuale substrate ale glicolizei, nu se mai produce. Mai mult, întrucât 6-fosfogluconatul este un inhibitor al 6-fosfoglucoizomerazei, enzimă ce introduce glucozo-6-fosfatul în glicoliză, acumularea acestuia ca răspuns la creşterea substratelor glicolizei (fructozo-1, 6-bisfosfatul), va determina inhibiţia căii glicolitice. Această corelaţie reglatoare reciprocă a celor două căi este evident avantajoasă pentru celulă.

Ribulozo-5-fosfatul este convertit la epimerul său, xilulozo-5-fosfatul (sub acţiunea ribulozo-5-fosfat epimerazei), ca şi la aldoizomerul său, ribozo-5-fosfatul (sub acţiunea ribozo-5-fosfat cetoizomerazei).



xilulozo—5—fosfat

ribozo-5-fosfat

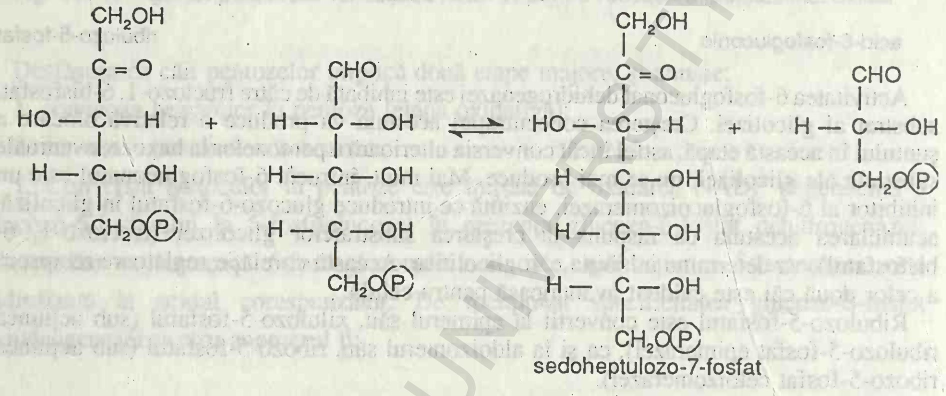
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentozele rezultate sunt utilizate în sinteza acizilor nucleici, a coenzimelor, a compuşilor macroergici sau sunt metabolizate în continuare.

În ţesuturile în care nevoia de NADPH şi de pentoze este echilibrată, calea pentozofosfaţilor parcurge exclusiv etapa transformării hexozelor în pentoze. Dacă însă nevoia de NADPH a ţesuturilor este mai mare decât cea de pentoze (ca în ţesuturile cu lipogeneză intensă), pentozele obţinute în exces faţă de necesităţi vor fi reconvertite la hexoze, care vor fi reintroduse în etapele oxidative descrise, furnizând NADPH necesar.

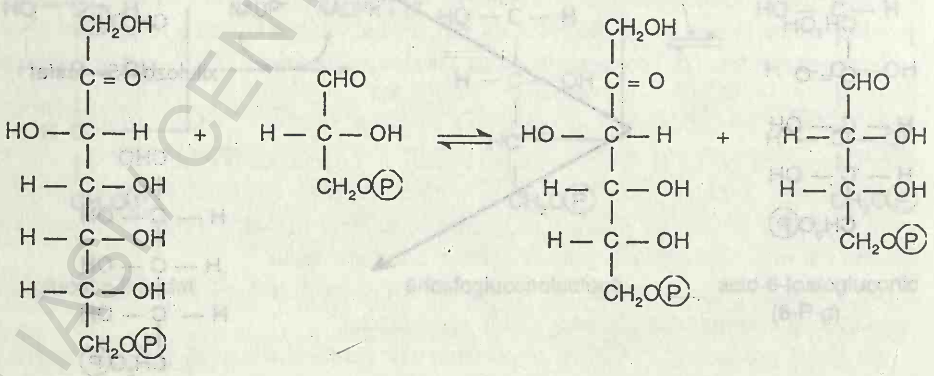
2. Conversia pentozelor la hexoze parcurge următoarele etape:

Xilulozo-5-fosfatul cedează, sub acţiunea transcetolazei, fragmentul glicolaldehidă pe ribozo-5-fosfat cu formarea sedoheptulozo-7-fosfatului şi gliceraldehid-3-fosfatului. Ca şi piruvat dehidrogenaza, transcetolaza are drept coenzimă tiaminpirofosfatul.



Formarea gliceraldehid-3-fosfatului reprezintă un punct de interferenţă a glicolizei cu şuntul pentozelor.

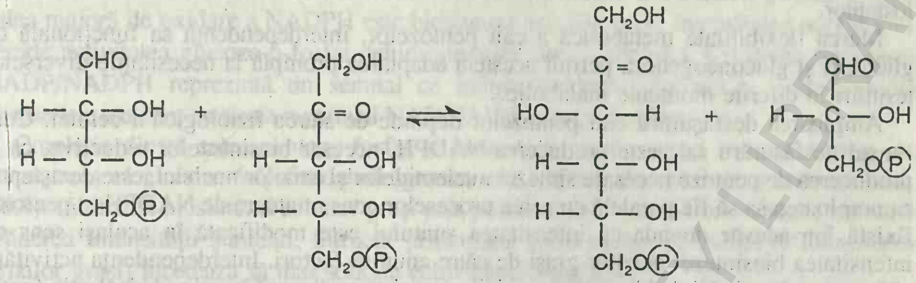
Sedoheptulozo-6-fosfatul, rezultat în reacţia de transcetolizare, suferă o reacţie de transaldolizare (transfer al restului dihidroxiacetonă) pe gliceraldehid-3-fosfat în urma căreia iau naştere eritrozo-4-fosfatul şi fructozo-6-fosfatul, intermediar comun al glicolizei şi căii pentozelor.



fructozo-6-fosfat eritrozo-4-fosfat

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eritrozo-4-fosfatul poate accepta un rest glicolaldehidă, provenit de la o altă moleculă de xilulozo-5-fosfat, formându-se fructozo-6-fosfat şi gliceraldehid-3-fosfat, ambele substrate ale glicolizei.



Cum toate reacţiile căii neoxidative a şuntului pentozelor sunt reversibile este evident că şi hexozofosfaţii pot fi convertiţi la pentozofosfaţi.

Desfăşurarea reacţiilor oxidative şi neoxidative ale şuntului poate fi sumarizată:

6 glucozo-6-fosfat + 12 $NADP^+$ + $6H_2O$ ⟶ 6 ribulozo-5-fosfat + 12 (NADPH + H^+) + 6 CO_2.

6 ribulozo-5-fosfat ⟶ 4 xilulozo-5-fosfat + 2 ribozo-5-fosfat

2 ribozo-5-fosfat + 2 xilulozo-5-fosfat ⟶ 2 sedoheptulozo-7-fosfat + 2 gliceraldehid-3-fosfat

2 sedoheptulozo-7-fosfat + 2 gliceraldehid-3-fosfat ⟶ 2 fructozo-6-fosfat + 2 eritrozo-4-fosfat

2 eritrozo-4-fosfat + 2 xilulozo-5-fosfat ⟶ 2 fructozo-6-fosfat + 2 gliceraldehid-3-fosfat

Bilanţul:

6 glucozo-6-fosfat + 12 $NADP^+$ + 6 H_2O ⟶ 6 CO_2 + 12 (NADPH + H^+) + 4 fructozo-6-fosfat + 2 gliceraldehid-3-fosfat

Gliceraldehid-3-fosfatul se poate izomeriza la dihidroxiaceton-fosfat, formând împreună fructozo-1, 6-bisfosfatul. Cum acesta din urmă suferă acţiunea fructozo-1, 6-bisfosfatazei, rezultă că din 6 molecule de glucozo-6-fosfat se obţin 5 molecule de fructozo-6-fosfat care prin parcurgerea etapelor gluconeogenezei formează 5 molecule de glucozo-6-fosfat. Bilanţul net al căii pentozelor este oxidarea unei molecule de glucoză, conform ecuaţiei:

glucozo-6-fosfat + 12 $NADP^+$ + 7 H_2O ⟶ 6 CO_2 + 12(NADPH + H^+) + PO_4H_3

În unele ţesuturi, cum ar fi muşchiul, enzimele etapelor oxidative ale şuntului pentozelor au activităţi extrem de reduse, necesarul de NADPH fiind minim. Nevoia de pentoze a muşchiului presupune, totuşi, posibilitatea conversiei hexozelor la pentoze. Aceasta se realizează prin parcurgerea în sens invers a reacţiilor catalizate de transaldolază şi transcetolază (ambele sunt reacţii reversibile) de către fructozo-6-fosfatul şi gliceraldehid-3-fosfatul obţinute în glicoliză:

fructozo-6-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat ⟶ xilulozo-5-fosfat + eritrozo-4-fosfat

eritrozo-4-fosfat + fructozo-6-fosfat ⟶ sedoheptulozo-7-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat

sedoheptulozo-7-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat ⟶ xilulozo-5-fosfat + ribozo-5-fosfat

Bilanţul căii inverse a etapei hexoze - pentoze va fi:

2 fructozo-6-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat ⟶ 2 xilulozo-5-fosfat + ribozo-5-fosfat.

Din două molecule de fructozo-6-fosfat şi una de gliceraldehid-3-fosfat se formează deci 3 molecule de ribozo-5-fosfat. În Fig. VII.18 este reprezentată secvenţa de reacţii a căii pentozofosfaţilor.

Marea flexibilitate metabolică a căii pentozelor, interdependenţa sa funcţională cu glicoliza şi gluconeogeneza permit acesteia adaptarea promptă la necesităţile diverselor ţesuturi în diferite momente metabolice.

Amploarea desfăşurării căii pentozelor depinde de starea fiziologică a celulei. Cum sensul desfăşurării sale este producerea NADPH, necesar biosintezelor reductive, ca şi producerea de pentoze necesare sintezei nucleotidelor şi acizilor nucleici, este de aşteptat ca amploarea sa să fie paralelă cu cea a proceselor consumatoare de NADPH şi pentoze. Există într-adevăr dovada că intensitatea şuntului este modificată în acelaşi sens cu intensitatea biosintezei acizilor graşi de către anumiţi factori. Interdependenţa activităţii căii pentozelor şi căii de biosinteză a acizilor graşi se realizează în primul rând prin faptul

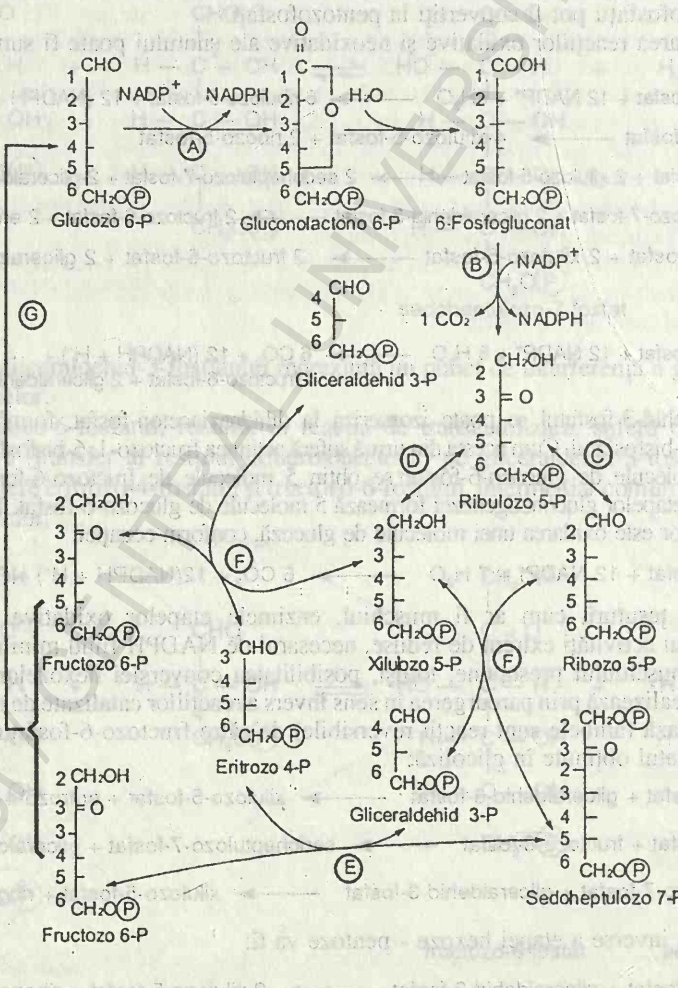


Fig. VII. 18 - Calea pentozo-fosfaţilor în ţesutul adipos

că viteza şuntului este controlată de NADPH, substrat al lipogenezei. Pe lângă faptul că este cofactor al glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, NADPH este şi inhibitor alosteric al acestei enzime. Este clar că reoxidarea NADPH va produce accelerarea şuntului. Cum calea majoră de oxidare a NADPH este biosinteza acizilor graşi, intensitatea acesteia va decide activitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, deci a şuntului. Creşterea raportului NADP/NADPH reprezintă un semnal ce induce oxidarea glucozei pe calea şuntului pentozelor, aşa cum creşterea raportului NAD/NADH induce glicoliza.

Corelaţia dintre calea pentozo-fosfat şi biosinteza acizilor graşi este atestată şi de constatarea că glucozo-6-fosfat dehidrogenaza este inhibată de acizii graşi activaţi (acil-CoA). Inhibarea biosintezei acizilor graşi prin produsul final - acil-CoA - induce totodată scăderea intensităţii şuntului, întrucât principalul consumator de NADPH (biosinteza acizilor graşi) încetează să mai solicite echivalenţi reducători.

Activitatea şuntului pentozelor este controlată în unele ţesuturi, în special în hematii, şi de către raportul glutation-oxidat glutation-redus (GSSG/GSH), întrucât reducerea GSSG la GSH consumă cantităţi semnificative de NADPH.

Viteza şuntului creşte de asemenea în perioade de creştere rapidă, care solicită biosinteză de proteine şi acizi nucleici.

De remarcat că activitatea şuntului poate fi reglată nu numai la nivelul activităţii enzimelor ci şi la cel al biosintezei acestora. Astfel, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza şi 6 fosfogluconat-dehidrogenaza sunt enzime adaptative a căror viteză de sinteză variază cu necesităţile de desfăşurare a şuntului. Sinteza dehidrogenazelor creşte, de exemplu, în glanda mamară în perioada de lactaţie sau scade în ficat şi ţesutul adipos în diabet şi inaniţie (insulina se comportă ca inductor al dehidrogenazelor).

Cercetările ultimilor ani au dovedti că în ficat şuntul pentozelor se desfăşoară pe o cale diferită de cea descrisă, caracteristică pentru ţesutul adipos. Diferenţele rezultă din posibilitatea ribozo-5-fosfatului de a se epimeriza, sub acţiunea unei pentozo-5-fosfat-2'-izomeraze proprii ficatului, la arabinozo-5-fosfat.

Ca şi în calea descrisă, o moleculă de ribozo-5-fosfat acceptă, într-o reacţie de transcetolizare, gruparea $\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ C=O \\ | \end{matrix}$ (glicolaldehidă) de la xilulozo-5-fosfat, generând sedo-heptulozo-7-fosfat şi dihidroxiaceton-fosfat. Dihidroxiaceton-fosfatul reacţionează cu arabinozo-5-fosfatul generând, sub acţiunea unei aldolaze, D-glicero-D-ido-octulozo-1,8-bisfosfatul. Acesta cedează, sub acţiunea unei fosfotransferaze, o grupare fosfat sedoheptulozo-7-fosfatului:

dihidroxiaceton-fosfat + arabinozo-5-fosfat ⟶ D-glicero-D-ido-octulozo-1,8-bisfosfat

D-glicero-D-ido-octulozo-1,8-bisfosfat + sedoheptulozo-7-fosfat ⟶ D-glicero-D-ido-octulozo-8-fosfat + sedoheptulozo-1,7-bisfosfat.

Sedoheptulozo-1,7-bisfosfatul, sub acţiunea unei aldolaze, se scindează la dihidroxiaceton-fosfat şi eritrozo-4-fosfat; acesta din urmă, într-o reacţie de transcetolizare, acceptă restul $\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ C=O \\ | \end{matrix}$ de pe D-gliceroD-ido-octulozo-8-fosfat generându-se hexozele glucozo-6-fosfat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şi fructozo-6-fosfat:

sedoheptulozo-1,7-bisfosfat ⟶ dihidroxiaceton-fosfat+eritrozo-4-fosfat

eritrozo-4-fosfat + D-glicero-D-ido-octulozo-8-fosfat ⟶ glucozo-6-fosfat + fructozo-6-fosfat.

Secvenţa de reacţii proprii căii pentozelor în ficat este reprezentată în Fig. VII.19.

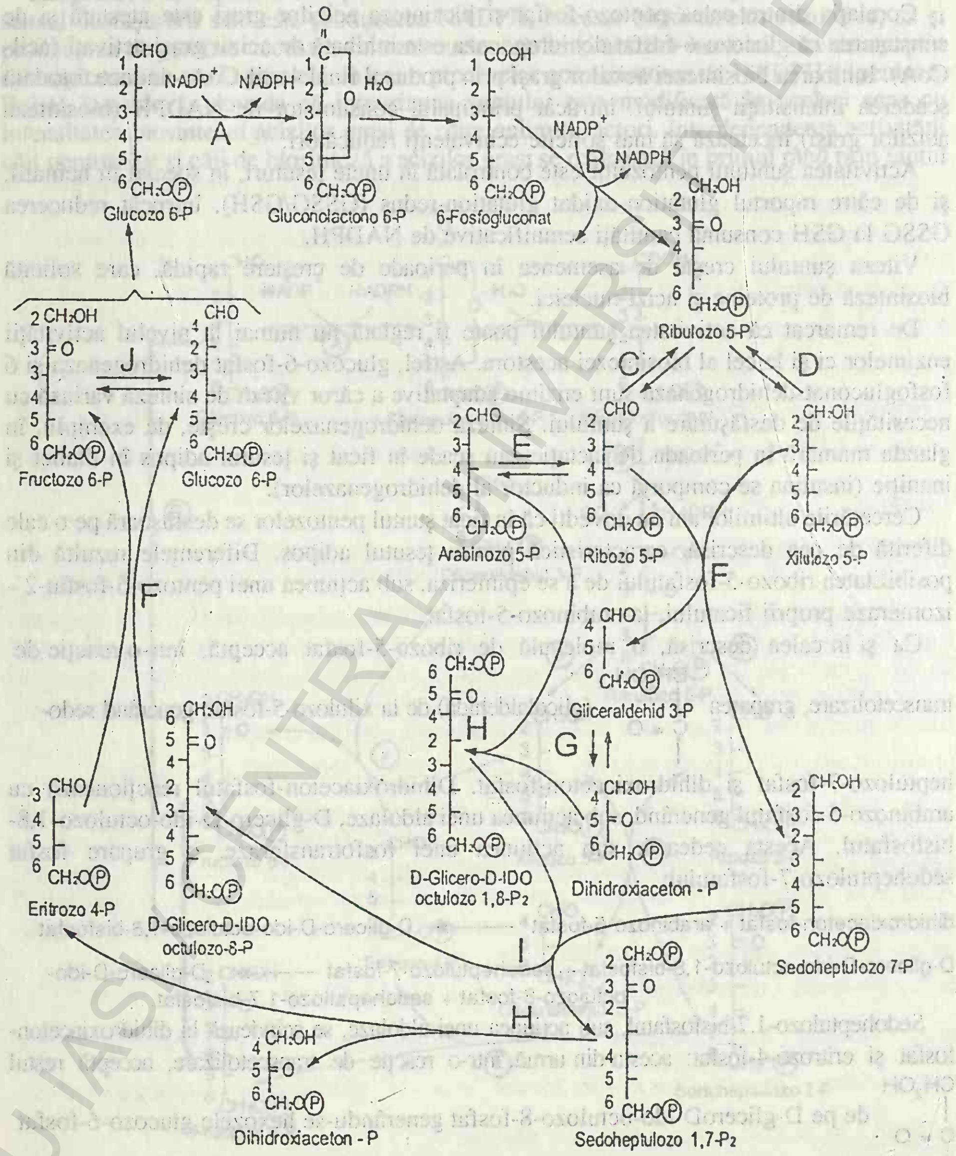


Fig. VII. 19 - Calea pentozo-fosfaţilor în ficat

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DEFICIENŢE ALE UNOR ENZIME IMPLICATE
ÎN CALEA PENTOZELOR

Deficienţa ereditară a unor enzime ale căii pentozelor poate constitui cauza unor dezordini foarte grave, mai ales în condiţii de mediu favorizante. Dintre acestea, deficienţa genetică a transcetolazei, exprimată în afinitatea extrem de redusă a acesteia pentru TPP, duce la tulburări neurologice şi comportamentale importante, agravate de aportul scăzut de tiamină în dietă (sindromul Wernicke-Korsakoff).

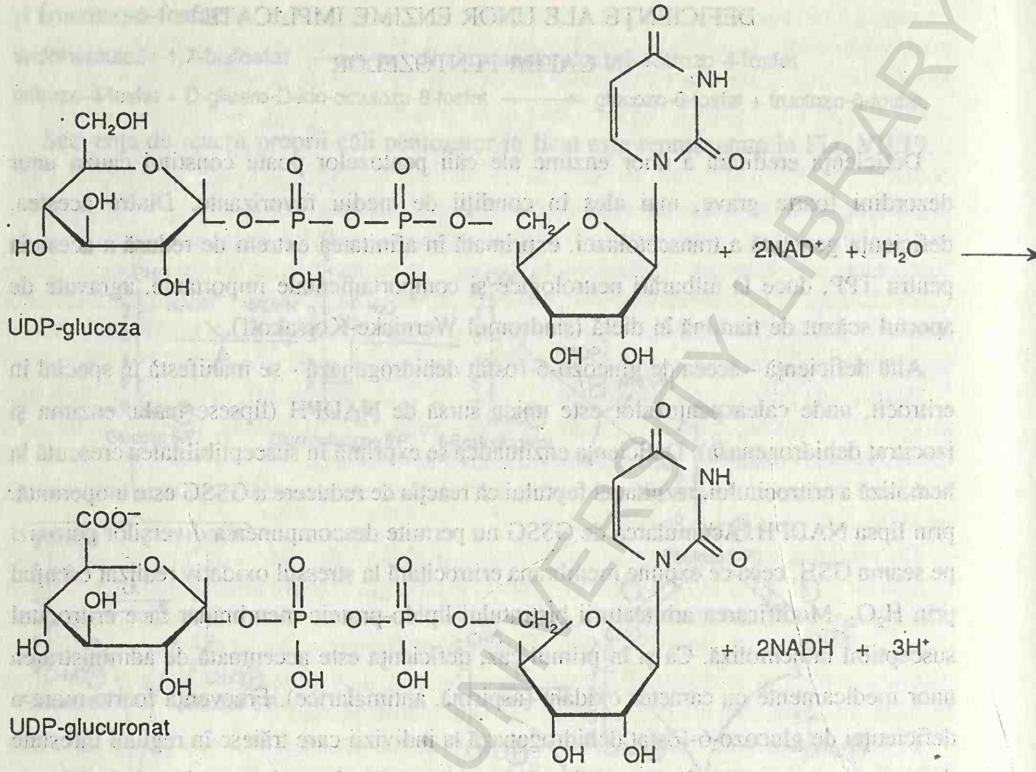
Altă deficienţă - aceea de glucozo-6-fosfat dehidrogenază - se manifestă în special în eritrocit, unde calea pentozelor este unica sursă de NADPH (lipsesc malic enzima şi izocitrat dehidrogenaza). Deficienţa enzimatică se exprimă în susceptibilitatea crescută la hemoliză a eritrocitului, rezultat al faptului că reacţia de reducere a GSSG este inoperantă, prin lipsa NADPH. Acumularea de GSSG nu permite descompunerea diverşilor peroxizi pe seama GSH, ceea ce expune membrana eritrocitară la stressul oxidativ realizat esenţial prin H_2O_2. Modificarea arhitecturii bistratului lipido-proteic membranar face eritrocitul susceptibil la hemoliză. Ca şi în primul caz, deficienţa este accentuată de administrarea unor medicamente cu caracter oxidant (aspirină, antimalarice). Frecvenţa foarte mare a deficienţei de glucozo-6-fosfat dehidrogenază la indivizii care trăiesc în regiuni infestate de malarie reprezintă o încercare de adaptare la mediu, întrucât parazitul malariei este dependent de concentraţii optime de GSH, implicit de buna funcţionare a căii pentozelor.

VII.4.2. CALEA ACIDULUI GLUCURONIC

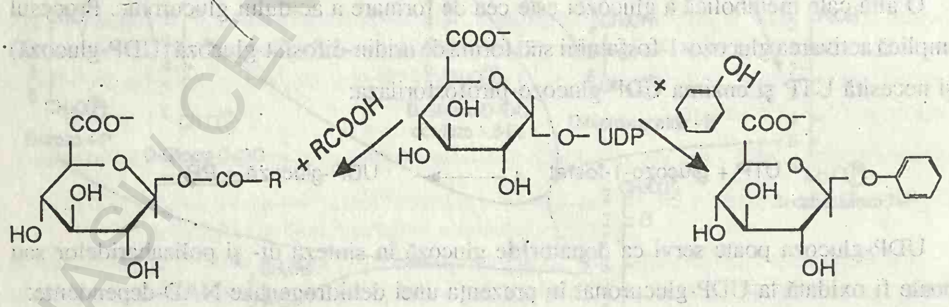
O altă cale metabolică a glucozei este cea de formare a acidului glucuronic. Procesul implică activarea glucozo-1-fosfatului sub formă de uridin-difosfat-glucoză (UDP-glucoză) şi necesită UTP şi enzima UDP-glucozo-pirofosforilaza:

$$\text{UTP + glucozo-1-fosfat} \longrightarrow \text{UDP-glucoză + PP}_i$$

UDP-glucoza poate servi ca donator de glucoză în sinteza di- şi polizaharidelor sau poate fi oxidată la UDP-glucuronat în prezenţa unei dehidrogenaze NAD-dependente:



UDP-glucuronatul reprezintă forma activă a glucuronatului. El poate servi ca donator de rest glucuronozil în reacţia de sinteză a unor polizaharide acide (vezi proteoglicani) ca şi în reacţia de conjugare cu diverşi compuşi endo- sau exogeni din clasa aminelor, fenolilor, acizilor carboxilici. Conjugarea cu glucuronatul, catalizată de glucuronozil transferaze, enzime prezente în special în ficat, conduce la glucuronozide (compuşi de natură glicozidică având configuraţia β):



Conjugarea cu glucuronatul (glucuronidarea) reprezintă o etapă importantă în detoxifierea compuşilor străini (xenobiotice) sau proprii organismului, formarea glucuronozidelor, compuşi cu polaritate crescută, facilitând transportul şi excreţia acestora. De menţionat că glucuronozil-transferazele sunt enzime inductibile care au activităţi

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

specifice reduse la naştere, maturizându-se însă din primele zile de viaţă. Imaturitatea sau deficienţele genetice ale glucuronozil-transferazelor duc la perturbarea proceselor de detoxifiere (vezi şi catabolismul hemoglobinei).

Acidul glucuronic poate urma, atunci când necesităţile organismului în acest compus sunt satisfăcute, o cale de metabolizare ce conduce la xiluloză, substrat al căii pentozelor. Metabolizarea acidului glucuronic debutează cu reducerea NADPH dependentă la acid gulonic care, intr-o reacţie NAD dependentă, este oxidat la acid 3-ceto-gulonic; acesta, prin decarboxilare, formează L-xiluloză. Conversia L-xilulozei la izomerul natural implică transformarea NADP dependentă la xilitol care, prin oxidare în prezenţa NAD, trece în D-xiluloză (Fig. VII.20).

Imposibilitatea conversiei L-xilulozei la D-xiluloză duce la eliminarea în urină a L-xilulozei şi reprezintă o enzimopatie datorată lipsei L-xilitol-dehidrogenazei NADP dependente. Această maladie ereditară este cunoscută sub numele de pentozurie esenţială.

La animalele capabile să sintetizeze acid asorbic (toate mamiferele, cu excepţia maimuţelor antropoide, omului, cobaiului), acidul L-gulonic poate fi convertit la acest compus. Reacţia implică formarea intermediară a gulonolactonei care, sub acţiunea gulonolacton-oxidazei, este oxidată la 2-ceto-L-gulonolactonă, aceasta izomerizându-se la acid ascorbic (Fig. VII.20).

Incapacitatea unor mamifere de a sintetiza ascorbat se datorează lipsei genetice a gulonolacton-oxidazei şi le face tributare aportului exogen de vitamină C.

VII.5. GLUCONEOGENEZA

Există posibilitatea ca nevoia de glucoză a ţesuturilor glucodependente, a căror existenţă depinde de aportul permanent al acestui zahăr (sistemul nervos central, muşchiul alb în contracţie, hematia), să nu fie satisfăcută.

O astfel de situaţie poate să apară în inaniţie, în cazul unui regim alimentar bogat în lipide şi proteine dar sărac în glucide, în efortul prelungit. În aceste condiţii are loc sinteza „de novo" a glucozei din compuşi neglucidici (sau nonhexoză): piruvat, aminoacizi, glicerol şi lactat, respectiv procesul de gluconeogeneză (GNG).

Satisfacerea nevoilor de glucoză a ţesuturilor glucodependente exclusiv pe seama gluconeogenezei are loc în condiţiile epuizării rezervelor de glicogen hepatic. Parţial, gluconeogeneza este solicitată şi în perioade interprandiale ce depăşesc 7-8 ore. Gluconeogeneza poate avea loc şi în condiţiile unui aport normal de glucoză, dar intensitatea procesului este extrem de redusă. Procesul decurge în acest caz numai din necesitatea reutilizării lactatului format în muşchi şi eritrocit sau a glicerolului rezultat din degradarea trigliceridelor din ţesutul adipos. Viteza gluconeogenezei va creşte proporţional cu activitatea musculară şi activitatea sistemului simpatic, de care depinde amploarea lipolizei în ţesutul adipos.

Gluconeogeneza este asigurată la mamifere esenţial de către ficat şi cortexul renal. Intensitatea procesului în cele două ţesuturi este aproximativ egală. Cu toate acestea, datorită diferenţei ponderale a celor două organe, rinichiul asigură numai 20% din totalul de glucoză produsă. Creierul şi muşchiul au şi ele, într-o oarecare măsură,

BOOK PASTEUR UNIVERSITY LIBRARY

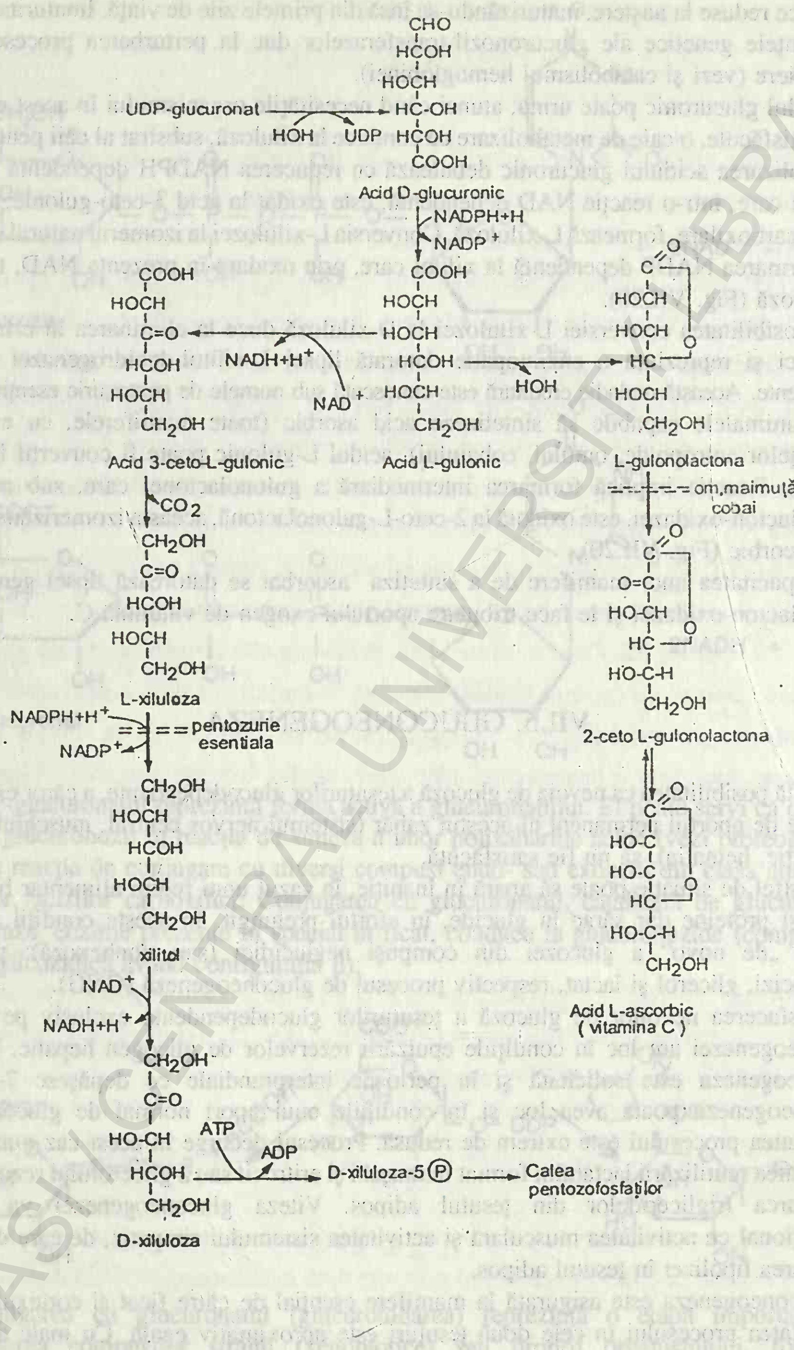


Fig. VII. 20 - Calea acidului glucuronic

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

abilitatea de a efectua gluconeogeneză, exclusiv pentru nevoile proprii întrucât sunt lipsite de glucozo-6-fosfatază.

Materia primă pentru procesul de gluconeogeneză este reprezentată de aminoacizii glucoformatori, lactat şi glicerol. Date recente indică şi acetona drept substrat al GNG.

Procesul de gluconeogeneză constă, central, în conversia piruvatului la glucoză şi decurge, în principiu, prin parcurgerea în sens inversă a etapelor glicolizei (glucoză → piruvat), cu menţiunea că trei dintre acestea sunt catalizate de enzime unidirecţionale, proprii gluconeogenezei. Aceste etape reprezintă reacţiile catalizate în sensul glicolizei de către kinaze: piruvat kinaza, 6-fosfofructo-1-kinaza, hexokinaza sau glucokinaza. Simpla reversiune a acestor reacţii este dezavantajoasă din punct de vedere energetic, întrucât reacţiile în sens invers ce le corespund au $\Delta G^{\circ\prime}$ foarte pozitiv. Gluconeogeneza dispune de căi proprii ce evită acest impas energetic.

Prima etapă în gluconeogeneză este reprezentată de conversia piruvatului la fosfoenolpiruvat (ea corespunde etapei glicolitice de transformare a fosfoenolpiruvatului la piruvat sub acţiunea piruvat kinazei) şi implică cooperarea a două sisteme enzimatice ce catalizează:

a. carboxilarea piruvatului la oxaloacetat (OAA)

$$CH_3CO - COOH + CO_2 + ATP + H_2O \longrightarrow HOOC - CH_2 - CO - COOH + ADP + P_i$$

b. conversia OAA la fosfoenolpiruvat (PEP)

$$HOOC - CH_2 - CO - COOH + GTP \rightleftharpoons \begin{array}{c} COOH \\ | \\ C - O \sim PO_3H_2 \\ \| \\ CH_2 \end{array} + GDP + CO_2$$

Intracelular reacţia este reversibilă.

Investiţia mare de energie pe care-o presupune această etapă face din gluconeogeneză un mare consumator de ATP (GDP + ATP → GTP + ADP)

De semnalat că CO_2 eliberat în reacţia b este, în fapt, cel utilizat în reacţia a; carboxilarea unui compus în scopul favorizării transformării sale ulterioare în alt compus însoţită de decarboxilare, este o strategie termodinamică utilizată de ţesuturi (vezi sinteza acizilor graşi).

Conversia piruvatului la oxaloacetat decurge intramitosolic şi este catalizată de piruvat carboxiligază (PCL), enzimă biotin dependentă, având ca efector alosteric pozitiv acetil~CoA. Piruvatul (provenit esenţial din alanină) ajuns în mitosol, este orientat spre formarea, prin carboxilare, a oxaloacetatului şi nu spre decarboxilare oxidativă, întrucât acetil~CoA, formată prin degradarea excesivă a acizilor graşi în condiţii de gluconeogeneză (în lipsa glucozei, nevoile energetice ale ţesuturilor glucoindependente se satisfac exclusiv pe seama trigliceridelor), este un efector pozitiv al piruvat-carboxiligazei şi un inhibitor al piruvat dehidrogenazei.

Conversia oxaloacetatului la fosfoenolpiruvat decurge, în cazul gluconeogenezei din piruvat, extramitosolic şi este catalizată de fosfoenolpiruvat carboxikinază (PEPCK). Cum membrana mitosolică este impermeabilă pentru oxaloacetat, acesta va fi translocat în citosol după conversia la compuşi permeabili ce pot fi reconvertiţi apoi la oxaloacetat.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Într-adevăr, oxaloacetatul dă naştere la malat sub acţiunea malat dehidrogenazei, în prezenţa NADH provenit din degradarea acizilor graşi. Malatul, permeabil prin membrană, ajunge în citosol unde va fi reconvertit la oxaloacetat sub acţiunea malat-dehidrogenazei citosolice. Reducerea oxaloacetatului la malat în interiorul mitosolului şi reoxidarea sa extramitosolică este favorizată de raportul NADH/NAD, mult mai crescut în mitosol decât în citosol (Fig. VII.21).

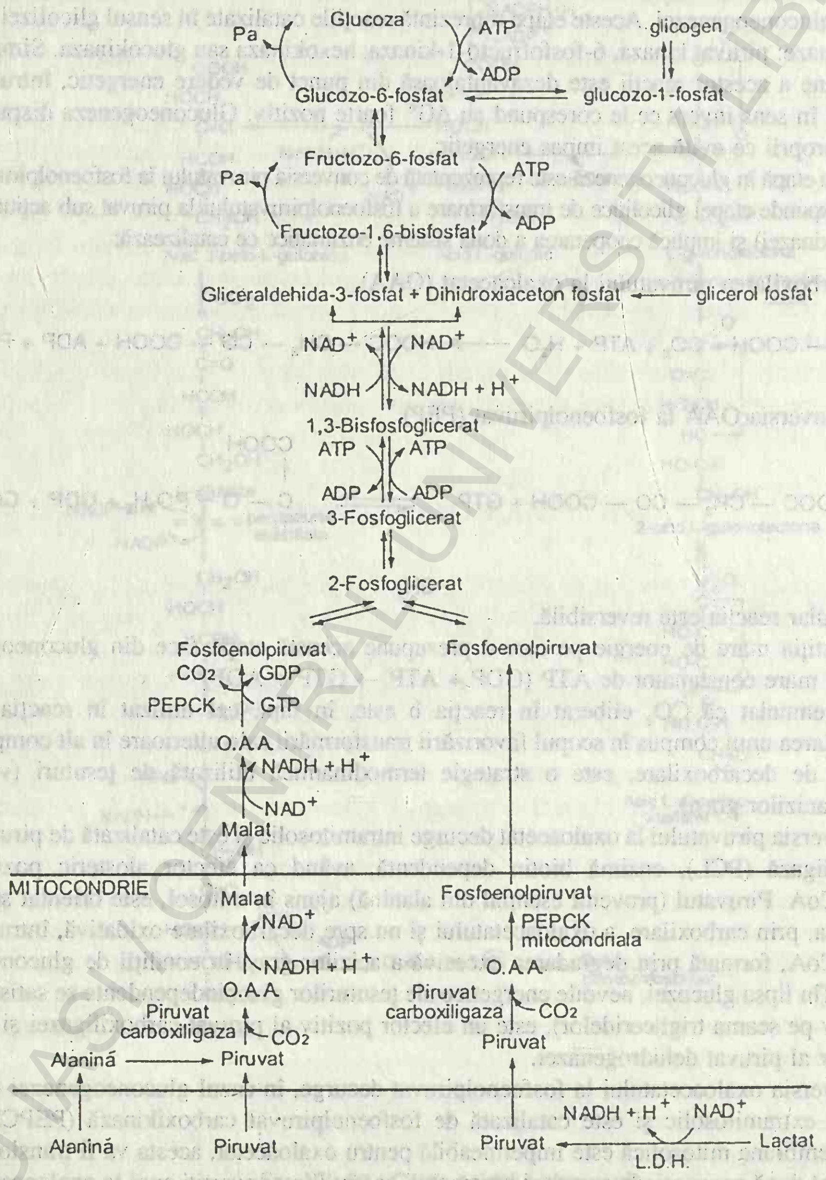
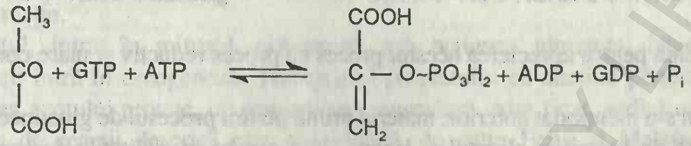


Fig. VII. 21 - Gluconeogeneza hepatică

Conversia oxaloacetatului la malat, urmată de reconversia sa la oxaloacetat în citosol, reprezintă o modalitate de export a NADH mitosolic fără de care gluconeogeneza n-ar fi posibilă.

Sub acţiunea fosfoenolpiruvat carboxikinazei, oxaloacetatul ajuns în citosol formează fosfoenolpiruvat. De remarcat că donatorul de fosfat specific în această reacţie este GTP. Reacţia globală de formare a fosfoenolpiruvatului din piruvat se poate scrie:



Cum $\Delta G^{o'}$ al reacţiei este de numai +0,2 kcal rezultă că reacţia este reversibilă. Creşterea raportului ATP/ADP favorizează reacţia de formare a fosfoenolpiruvatului, reprezentând o condiţie a desfăşurării gluconeogenezei, alături de necesitatea unor concentraţii mari de piruvat.

Următoarele etape ale gluconeogenezei presupun convertirea fosfoenolpiruvatului la fructozo-1,6-bisfosfat. Aceasta se realizează prin parcurgerea în sens invers a reacţiilor glicolizei, reacţii catalizate de enzime bidirecţionale - comune gluconeogenezei şi glicolizei:

fosfoenolpiruvat ⇌ (enolaza) 2-fosfoglicerat ⇌ 3-fosfoglicerat ⇌ (ATP / ADP) 1,3-bisfosfoglicerat ⇌ ($NADH + H^+$ / NAD^+) gliceraldehid-3-fosfat ⇌ fructozo 1,6-bisfosfat

gliceraldehid-3-fosfat ⇌ dihidroxiaceton fosfat

De remarcat că NADH necesar reducerii 3-fosfogliceratului la gliceraldehid-3-fosfat provine tot din β-oxidarea acizilor graşi.

Transformarea fructozo-1,6-bisfosfatului în fructozo-6-fosfat nu se face prin simpla reversiune a reacţiei catalizate de 6-fosfofructokinaza-1 ($\Delta G^{0'}$ = +3,4 kcal) ci necesită, din motive deja expuse, intervenţia unei enzime proprii, fructozo-1,6-bisfosfataza:

$$\text{fructozo-1,6-bisfosfat} + H_2O \longrightarrow \text{fructozo-6-fosfat} + P_i$$

Fructozo-1,6-bisfosfataza este o enzimă alosterică sensibilă la statusul energetic celular, al cărui indicator fidel este, aşa cum am văzut, concentraţia AMP. Enzima este inhibată de AMP şi stimulată de ATP. Fructozo-1,6-bisfosfatul, substratul său, cât şi fructozo-2,6-bisfosfatul sunt inhibitori ai enzimei.

Fructozo-6-fosfatul formează sub acţiunea hexozoizomerazei, enzimă bidirecţională, glucozo-6-fosfatul care, sub acţiunea glucozo-6-fosfatazei, enzimă unidirecţională ancorată pe membrana reticulului endoplasmic este hidrolizat la glucoză. Localizarea enzimei în ficat asigură acestuia rolul de furnizor al glucozei pentru satisfacerea nevoilor energetice şi de sinteză ale ţesuturilor extrahepatice. Este posibil ca glucozo-6-fosfatul,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rezultat al gluconeogenezei, să fie utilizat, după conversia la glucozo-1-fosfat, în sinteza glicogenului. Orientarea glucozo-6-fosfatului spre formarea de glucoză sau spre sinteza de glicogen va fi decisă, în cele din urmă, de raportul de concentraţie dintre glicogenul hepatic şi glucoza sanguină.

Ecuaţia globală a gluconeogenezei:

$$2 \text{ piruvat} + 6\ ATP + 2\ NADH + 2H^+ + 4\ H_2O \longrightarrow \text{glucoză} + 6\ ADP + 6\ P_i + 2\ NAD^+,$$

este elocventă pentru aprecierea acestui proces ca proces reductiv şi mare consumator de energie.

Aşa cum s-a menţionat anterior, materia primă pentru procesul de gluconeogeneză este reprezentată de proteine, glicerol şi lactat. Vom urmări modalităţile de transformare a acestora în substrate direct utilizabile în gluconeogeneză.

Accesul proteinelor la gluconeogeneză, respectiv al aminoacizilor glucoformatori (toţi, cu excepţia leucinei şi lisinei), se realizează prin transformarea lor în substrate ale ciclului Krebs, direct convertibile la oxaloacetat sau piruvat. Astfel, glutamatul, glutamina, histidina, arginina, prolina participă la gluconeogeneză prin formare de α-cetoglutarat care, prin parcurgerea ciclului Krebs, formează oxaloacetat. Aspartatul generează direct oxaloacetat prin transaminare. Metionina şi izoleucina se metabolizează la propionil-CoA, care se converteşte la succinil-CoA şi apoi la oxaloacetat:

$$\underset{\text{propionil} \sim \text{CoA}}{CH_3-CH_2-CO\sim SCoA} + CO_2 + ATP \xrightarrow{\text{carboxiligaza}} \underset{\text{metilmalonil}\sim\text{CoA}}{COOH-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-CO\sim SCoA}$$

$$\xrightarrow[\text{B}_{12}\text{ dependentă}]{\text{izomerază}} \underset{\text{succinil}\sim\text{CoA}}{COOH-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA}$$

Propionil-CoA rezultă şi prin oxidarea acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon - deci nu tuturor acizilor graşi li se aplică stigmatul de ne-glucoformatori.

Tirozina şi fenilalanina sunt convertibile la oxaloacetat prin fumarat, produsul de catabolism al celor doi aminoacizi (Fig. VII.16).

Deşi toţi aminoacizii enumeraţi sunt potenţial gluconeogeni, alanina, serina şi glicina sunt cei care formează cantităţi semnificative de glucoză in vivo. Ei se transformă prin transaminare în piruvat, care formează apoi oxaloacetatul.

Ca precursor glucidic de natură proteică, alanina ocupă un loc cu totul deosebit. Este demonstrat faptul că viteza producerii glucozei din alanină este mai mare decât a oricărui alt aminoacid. Sursa majoră de alanină pentru gluconeogeneza hepatică şi renală este muşchiul, unde ea rezultă nu atât prin catabolismul proteinelor, cât mai ales prin sinteză din piruvat. Piruvatul muscular derivă din glucoză, prin glicoliză, şi din aminoacizi ce se pot converti la piruvat. Înainte de a părăsi muşchiul, piruvatul se

transaminează la alanină, în special pe seama aminoacizilor ramificaţi care se dezaminează preferenţial în muşchi şi nu în ficat.

Alanina formată în muşchi ajunge în ficat unde se transaminează pe α-cetoglutarat formând piruvat şi glutamat. Piruvatul furnizează scheletul hidrocarbonat pentru sinteza „de novo" a glucozei. Transportul piruvatului din muşchi în ficat, în vederea intrării sale în gluconeogeneza hepatică, este o strategie remarcabilă a organismului care „pasează" ficatului o sarcină energofagă numai pentru a păstra disponibilul de ATP muscular pentru contracţie.

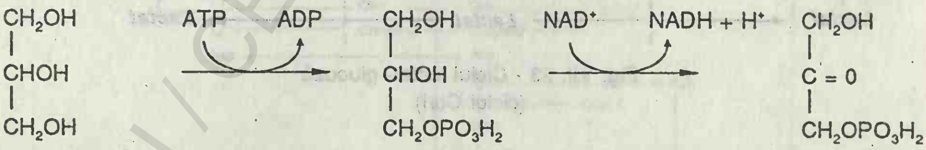
Glutamatul, intrat în mitosol, eliberează, sub acţiunea glutamat dehidrogenazei, amoniac care intră în ureogeneză. Transportul piruvatului ca alanină permite, evident, şi expedierea azotului proteic, de provenienţă musculară, spre ficat, sediul ureogenezei.

Secvenţa de reacţii descrisă este considerată, de către Felig şi Malette, un ciclu alanină - glucoză, analog ciclului lactat - glucoză (Fig. VII.22).

De remarcat că alanina, pe lângă faptul că furnizează substrate gluconeogenezei, intervine şi în reglarea procesului în ţesutul hepatic, inhibând piruvat kinaza. Blocând conversia fosfoenolpiruvatului la piruvat, alanina favorizează utilizarea precursorilor glucozei în gluconeogeneză.

Gluconeogeneza din lactat presupune conversia sa în hepatocit la piruvat. Lactatul, provenit esenţial din muşchi, în condiţii de relativă anaerobioză (din necesitatea reoxidării NADH care să permită desfăşurarea glicolizei), ca şi din eritrocit, tributar din punct de vedere energetic glicolizei, suferă în ficat acţiunea lactat dehidrogenazei, formând piruvat care este convertit la OAA şi apoi la fosfoenolpiruvat, în mitosol, sub acţiunea unei PEPCK mitosolice (Fig. VII.21). De remarcat că oxaloacetatul nu se mai exportă ca malat, ca în cazul gluconeogenezei din piruvat, întrucât sursa de NADH necesar gluconeogenezei este, în acest caz, însuşi lactatul. Acesta formează, aşa cum s-a arătat, glucoză, care poate fi trimisă muşchiului în contracţie sau eritrocitului (Fig. VII.23).

Gluconeogeneza din lipide. Acizii graşi cu număr par de atomi de carbon sunt degradaţi prin β-oxidare până la acetil-CoA, care nu este glucogen. Participarea semnificativă a lipidelor la gluconeogeneză se realizează prin componenta glicerol. Rezultat al lipolizei din ţesutul adipos, glicerolul este convertit în ficat, sub acţiunea glicerol kinazei, la α-glicerol-fosfat care, sub acţiunea unei dehidrogenaze specifice, formează dihidroxiaceton fosfat, intermediar al glicolizei:



Împreună cu 3-fosfo-gliceraldehida, căreia îi poate da naştere, formează fructozo-1,6-bisfosfat. Gluconeogeneza din glicerol reprezintă aproximativ 10% din capacitatea totală de gluconeogeneză a ficatului.

De remarcat că gluconeogeneza hepatică sau renală din lactat (eritrocit, muşchi scheletic în contracţie), alanină (muşchi în condiţii catabolice) şi glicerol (ţesutul adipos) reprezintă o modalitate de resinteză a glucozei din compuşi rezultaţi prin metabolizarea

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

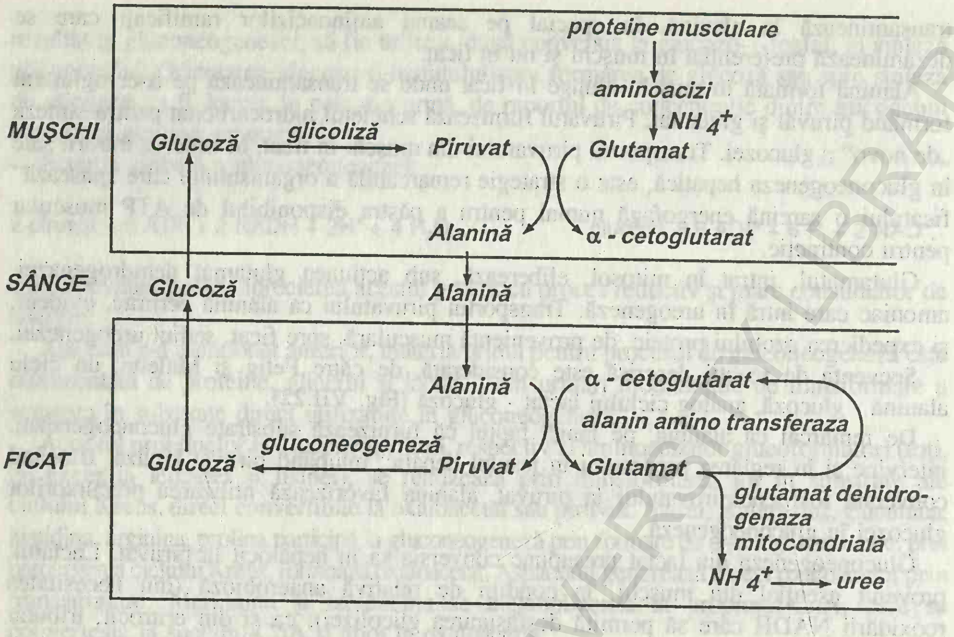


Fig. VII. 22 - Ciclul alanină-glucoză
(ciclul Felig-Malette)

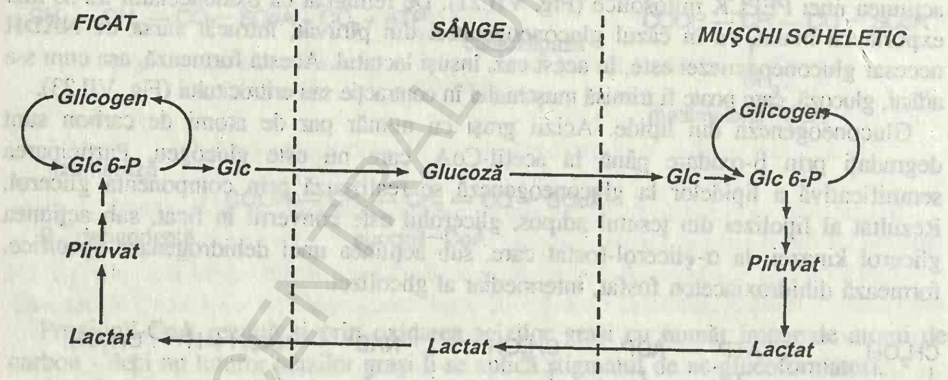


Fig. VII. 23 - Ciclul lactat- glucoză
(ciclul Cori)

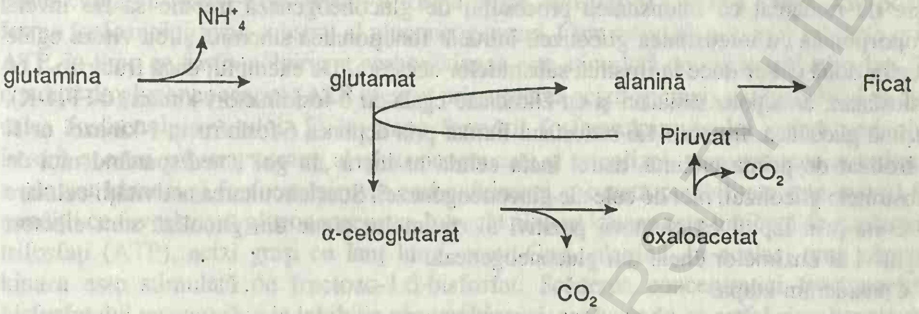
sa parţială în ţesuturile extrahepatice şi extrarenale, care devin beneficiarele procesului de gluconeogeneză. Aceşti compuşi nu ar avea nici o posibilitate de evoluţie ulterioară în ţesuturile în care se formează astfel încât participarea lor la GNG este salutară.

Evident, ciclul Cori ca şi ciclul Felig nu constituie surse pentru sinteza netă de glucoză prin gluconeogeneză; sursă pentru sinteza netă de glucoză sunt aminoacizii glucoformatori rezultaţi, prin excelenţă, în cursul proteolizei musculare. Dintre aceştia, alanina, glutamina şi glicina ocupă o poziţie specială.

BOU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Alanina s-a dovedit a fi cel mai important aminoacid gluconeogen din punct de vedere cantitativ. Ficatul este apt să convertească alanina la glucoză chiar şi la concentraţii de 20-30 de ori mai mari decât cele fiziologice.

Glutamina, eliberată de muşchi, ajunge în mucoasa intestinală care o foloseşte ca sursă de energie metabolică. Dintre cei cinci atomi de carbon din glutamină doi vor fi oxidaţi la CO_2 iar alanina rezultată va fi utilizată în gluconeogeneza hepatică.



Glicina este transformată în serină şi utilizată în gluconeogeneză.

O ultimă remarcă legată de gluconeogeneza din aminoacizi: întrucât acest proces utilizează strict scheletul hidrocarbonat al aminoacizilor rezultat din îndepărtarea grupării amino (prin transdezaminare), gluconeogeneza din aminoacizi este inevitabil cuplată cu sinteza ureei. Fig. VII.24 redă cele două căi de acces ale alaninei în gluconeogeneză şi utilizarea amoniacului în ureogeneză.

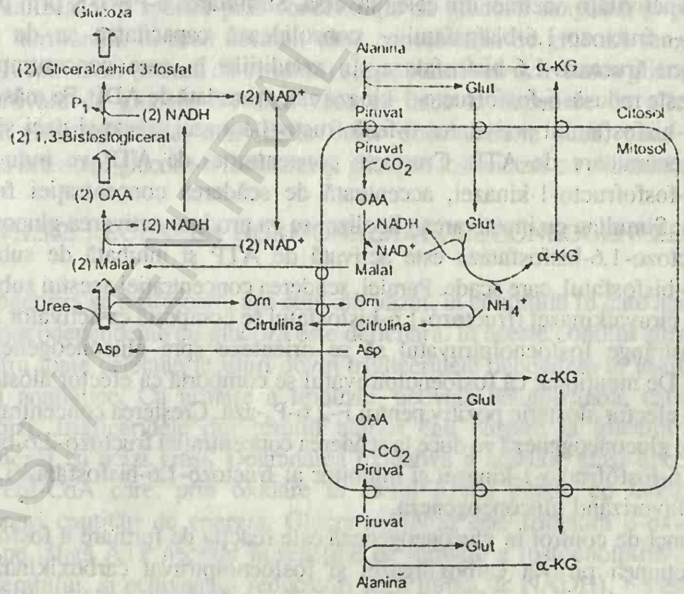


Fig. VII. 24 - Gluconeogeneza din alanină şi relaţiile ei cu biosinteza ureei (după Devlin)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.5.1. REGLAREA ALOSTERICĂ A GLUCONEOGENEZEI

Reglarea gluconeogenezei se realizează esenţial prin modularea activităţii enzimelor cheie: piruvat carboxiligaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza, fructozo-1,6-bisfosfataza, glucozo-6-fosfataza - care sunt enzime alosterice - de către anumiţi efectori metabolici. Este de remarcat că intensitatea procesului de gluconeogeneză trebuie să fie invers proporţională cu intensitatea glicolizei, întrucât funcţionarea sincronă şi cu viteze egale a celor două căi ar duce la irosirea substratelor acestora. De exemplu, dacă fructozo-1,6-bisfosfataza ar acţiona simultan şi cu eficacitate egală cu 6-fosfofructo-1-kinaza (6-FF-1-K), enzimă glicolitică, fructozo-1,6-bisfosfatul format prin acţiunea 6-fosfofructo-1-kinazei ar fi hidrolizat de prima enzimă, astfel încât celula ar lucra „în gol", nedispunând nici de substratele glicolizei, nici de cele ale gluconeogenezei. Scurtcircuitarea activităţii celulare se evită prin faptul că efectorii pozitivi ai enzimelor cheie din glicoliză sunt efectori negativi ai enzimelor cheie din gluconeogeneză.

Considerăm etapa:

$$\text{fructozo-6-fosfat} + ATP \underset{\text{fructozo-1,6-bisfosfatază}}{\overset{\text{6-FF-1-K}}{\rightleftharpoons}} \text{fructozo-1,6-bisfosfat} + ADP$$

Se ştie că 6-fosfofructo-1-kinaza este stimulată de ADP şi AMP şi inhibată de ATP, în timp ce fructozo-1,6-bisfosfataza este stimulată de ATP şi inhibată de AMP. Este evident că acele condiţii intracelulare care favorizează activitatea unei enzime sunt absolut defavorabile activităţii enzimei din calea inversă. Stimularea 6-FF-1-K prin produsul său de reacţie – fructozo-1,6-bisfosfatul – consolidează capacitatea sa de funcţionare nesincronă cu fructozo-1,6-bisfosfataza. În condiţiile în care concentraţia de ATP intracelular este redusă, 6-fosfofructo-1-kinaza este stimulată de ADP. Pe măsura formării fructozo-1,6-bisfosfatului activitatea 6-fosfofructo-1-kinazei creşte şi deci şi viteza căii glicolitice generatoare de ATP. Creşterea concentraţiei de ATP va induce scăderea activităţii 6-fosfofructo-1-kinazei, accentuată de scăderea concentraţiei fructozo-1,6-bisfosfatului. Simultan cu inactivarea glicolizei se va produce activarea gluconeogenezei, întrucât fructozo-1,6-bisfosfataza este activată de ATP şi inhibată de substratul său, fructozo-1,6-bisfosfatul, care scade. Paralel, scăderea concentraţiei acestui substrat induce o inhibiţie a piruvatkinazei (fructozo-1,6-bisfosfatul se comportă ca activator al enzimei), fapt ce constrânge fosfoenolpiruvatul să se orienteze spre gluconeogeneză, care se accelerează. De menţionat că fosfoenolpiruvatul se comportă ca efector alosteric negativ al FF-2-K şi efector alosteric pozitiv pentru F-2,6-P_2-aza. Creşterea concentraţiei acestuia în condiţii de gluconeogeneză va duce la scăderea concentraţiei fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al 6-fosfofructo-1-kinazei şi inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, deprimând glicoliza şi favorizând gluconeogeneza.

Un alt punct de control în gluconeogeneză este reacţia de formare a fosfoenolpiruvatului sub acţiunea piruvat carboxiligazei şi fosfoenolpiruvat carboxikinazei. Piruvat carboxiligaza, enzimă ce catalizează conversia la oxaloacetat a piruvatului, se află în competiţie pentru acelaşi substrat cu enzima ce catalizează decarboxilarea oxidativă a piruvatului (piruvat dehidrogenaza).

În condiţii de gluconeogeneză nevoile energetice ale ţesuturilor sunt satisfăcute, din plin, pe seama excesului lipidic. Ca urmare, fosforilarea oxidativă este încetinită, prin lipsa acceptorului de fosfat (ADP), acumulându-se NADH, inhibitor al enzimelor cheie ale ciclului Krebs.

Concentraţiile mari de acetil~CoA acumulate produc stimularea piruvat carboxiligazei şi inhibiţia piruvat dehidrogenazei, orientând astfel piruvatul spre oxaloacetat. Acesta se poate cupla cu acetil~CoA pentru a forma citrat, substrat al ciclului Krebs, sau poate forma fosfoenolpiruvat, substrat al gluconeogenezei. Cum citrat sintaza este inhibată prin ATP, în timp ce fosfoenolpiruvat carboxikinaza este stimulată de nucleozid trifosfaţi, în condiţii de gluconeogeneză (ATP crescut prin arderea acizilor graşi) oxaloacetatul va lua calea fosfoenolpiruvatului. Şi în etapa formării fosfoenolpiruvatului există pericolul irosirii acestui substrat comun al gluconeogenezei şi glicolizei, prin acţiunea simultană a piruvat kinazei şi fosfoenolpiruvat carboxikinazei. Această posibilitate este evitată în condiţii ce favorizează gluconeogeneza, întrucât piruvat kinaza este inhibată de nucleozid trifosfaţi (ATP), acizi graşi cu lanţ lung, acetil-CoA, alanină. În acelaşi timp piruvat kinaza este stimulată de fructozo-1,6-bisfosfat. Scăderea concentraţiei fructozo-1,6-bisfosfatului va contribui la inhibiţia piruvat kinazei, excluzându-se astfel simultaneitatea de acţiune a piruvat kinazei şi fosfoenolpiruvat carboxikinazei.

Evitarea funcţionării simultane, deci a parcurgerii unui ciclu inutil, este necesară şi în cazul conversiei glucozo-6-fosfat → glucoză. Funcţionarea concomitentă a glucozo-6-fosfatazei şi glucokinazei ar duce la un consum inutil de ATP. Spre deosebire de cazurile anterior descrise, cuplul glucokinază-glucozo-6-fosfatază nu este supus acţiunii unor efectori metabolici cu acţiune antagonistă. Evitarea funcţionării simultane a celor două enzime se realizează în special prin concentraţia de glucoză sanguină şi prin acţiunea unor factori hormonali. În mod normal, când concentraţia de glucoză sanguină creşte, activitatea glucokinazei (indusă de insulină) creşte paralel cu activitatea glicogen sintazei, care este activată de glucozo-6-fosfat, ceea ce duce la depunere de glicogen. Când concentraţia glucozei scade, activităţile celor două enzime scad, ceea ce duce la predominenţa activităţii glucozo-6-fosfatazei şi glicogen fosforilazei cu eliberare de glucoză.

VII.5.2. REGLAREA HORMONALĂ A GLUCONEOGENEZEI

Gluconeogeneza se desfăşoară, aşa cum am văzut, în condiţiile în care aprovizionarea ţesuturilor glucodependente cu glucoză este deficitară. În aceste condiţii sursă majoră de energie pentru toate celelalte ţesuturi devin trigliceridele depozitate în ţesutul adipos în cursul fazei anabolice. Ca urmare a lipolizei, activată de glucagon, catecolamine şi glucocorticoizi, trigliceridele din ţesutul adipos dau naştere la glicerol, substrat al gluconeogenezei, şi acizi graşi. Degradarea oxidativă a acizilor graşi duce la cantităţi mari de acetil-CoA care, prin oxidare în ciclul Krebs cuplat cu lanţul respirator, eliberează mari cantităţi de energie. Gluconeogeneza este tributară β-oxidării care îi furnizează, pe lângă ATP necesar în reacţiile de formare a fosfoenolpiruvatului şi 1,3-bisfosfogliceratului, şi echivalenţi reducători (sub formă de NADH), necesari reducerii 3-fosfogliceratului la 3-fosfogliceraldehidă. NADH, format în cursul oxidării acizilor graşi în mitosol, ajunge în citosol, sediul gluconeogenezei, ca malat. Mai mult, acetil~CoA,

rezultat prin β-oxidare, activează piruvat carboxiligaza şi inhibă piruvat dehidrogenaza, decizând intrarea piruvatului în gluconeogeneză. Stimularea lipolizei prin glucagon şi glucocorticoizi favorizează deci gluconeogeneza.

Glucocorticoizii favorizează gluconeogeneza şi prin stimularea proteolizei extrahepatice, prin excelenţă musculară.

Efectul glucagonului, glucocorticoizilor cât şi al catecolaminelor nu se limitează însă la furnizarea de substrate pentru gluconeogeneză; aceşti hormoni stimulează direct gluconeogeneza prin inducţia enzimelor cheie ale acesteia cât şi a unor aminotransferaze.

Un raport glucagon/insulină mare va produce, de asemenea, represia glucokinazei şi piruvatkinazei.

Acţiunea glucagonului se realizează şi la nivelul activităţii acestor enzime, via AMP_c. Fosforilarea fosfoenolpiruvat carboxikinazei, fructozo-1,6-bisfosfatazei, sub acţiunea protein kinazei AMP_c dependente, coincide cu activarea acestor enzime. Reamintim că piruvat kinaza hepatică este o enzimă interconvertibilă a glicolizei, activă în formă defosfo.

Stimularea prin glucagon a gluconeogenezei hepatice se realizează şi prin controlul concentraţiei de fructozo-2,6-bisfosfat (vezi glicoliza). Fructozo-2,6-bisfosfatul reprezintă cel mai eficient efector alosteric pozitiv al 6-fosfofructo-1-kinazei; (creşte afinitatea pentru substrat şi scade afinitatea pentru efectorii alosterici negativi: ATP şi citrat), fiind în acelaşi timp efector alosteric negativ al fructozo-1,6-bisfosfatazei. Prin activarea protein kinazei AMP_c dependentă glucagonul fosforilează enzima bifuncţională 6-fosfofructo-2-kinaza/fructozo-2,6-bisfosfataza, ceea ce va duce la inhibarea activităţii fosfo-fructo-2-kinazei şi creşterea activităţii fructozo-2,6-bisfosfatazei (Fig. VII.25b). Scăderea concentraţiei fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al 6-fosfofructo-1-kinazei şi inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, ca urmare a acţiunii glucagonului, va avea ca efect net accelerarea gluconeogenezei în defavoarea glicolizei.

Hormonul fazei anabolice - insulina - inhibă gluconeogeneza, reprimând sinteza enzimelor cheie ale acesteia. Mai mult, în condiţiile secreţiei de insulină, lipoliza este inhibată iar glicoliza stimulată, condiţie defavorabilă desfăşurării gluconeogenezei.

În Fig. VII.25a se reprezintă modalităţile de reglare a glicolizei şi gluconeogenezei.

VII. 6 . METABOLISMUL GLICOGENULUI

Aşa cum s-a arătat, glicogenul reprezintă forma de depozitare a excesului de glucide în organismele animale, la care se face apel în faza catabolică a metabolismului. Cantităţi semnificative de glicogen se găsesc în muşchi (1% din greutate) şi în ficat (6% din greutate). Depozitele de glicogen sunt utilizate de către cele două ţesuturi în scopuri diferite; ficatul le utilizează în scopul menţinerii glicemiei, în timp ce muşchiul îşi satisface strict necesităţile proprii de glucoză. Rezervele de glicogen scad dramatic în ficat în cursul a 12-20 ore de inaniţie, iar în muşchi în cursul unei activităţi musculare intense, ca urmare a glicogenolizei; ele se refac în faza anabolică a metabolismului, caracterizată prin abundenţa de substrate energogene (glucidice). Graţie rezervelor de glicogen mâncăm intermitent şi nu continuu.

Glicogenoliza şi glicogenosinteza decurg, ca şi alte căi metabolice paralele, pe căi distincte ce se conformează principiului general al dualităţii reglării, care asigură funcţionarea lor nesincronă.

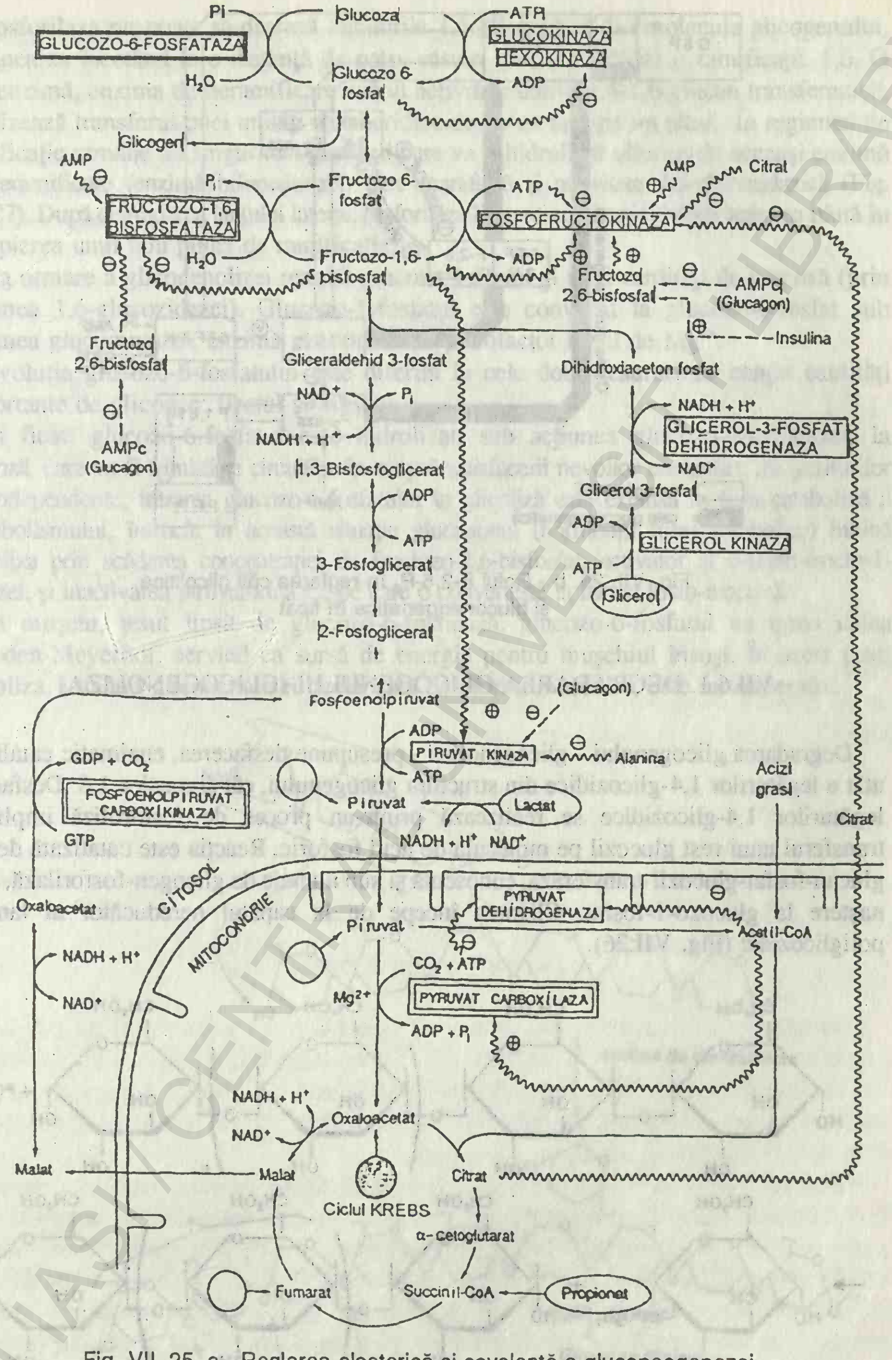


Fig. VII. 25. a - Reglarea alosterică şi covalentă a gluconeogenezei (după Harper's Biochemistry, 1993)

metaboliţi provenind din aminoacizi glucogenici

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

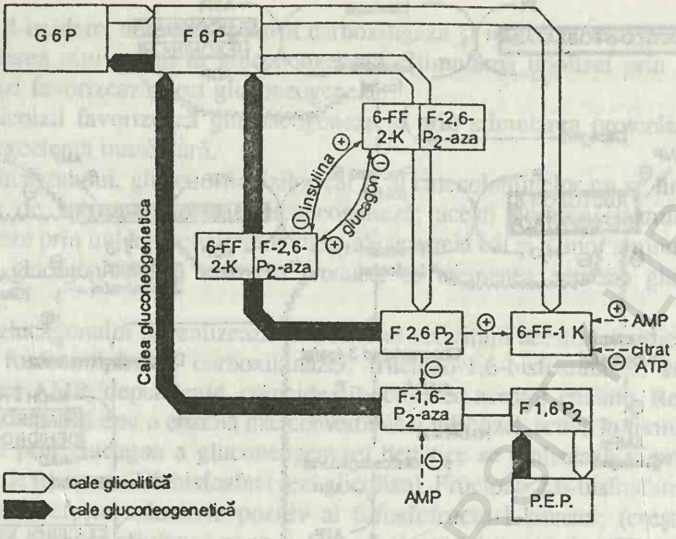


Fig. VII. 25. b - Rolul F-2,6-P_2 în reglarea căii glicolitice și gluconeogenetice în ficat

VII.6.1. DEGRADAREA GLICOGENULUI (GLICOGENOLIZA)

Degradarea glicogenului - glicogenoliza - presupune desfacerea, enzimatic catalizată, atât a legăturilor 1,4-glicozidice din structura glicogenului, cât şi a celor 1,6. Desfacerea legăturilor 1,4-glicozidice se realizează printr-un proces de fosforoliză implicând transferul unui rest glucozil pe molecula de acid fosforic. Reacţia este catalizată de 1,4-glucan-fosfat-glucozil-transferaza, cunoscută şi sub numele de glicogen-fosforilază, dând naştere la glucozo-1-fosfat. Clivarea începe de la capătul nereducător al lanţului poliglicozidic (Fig. VII.26).

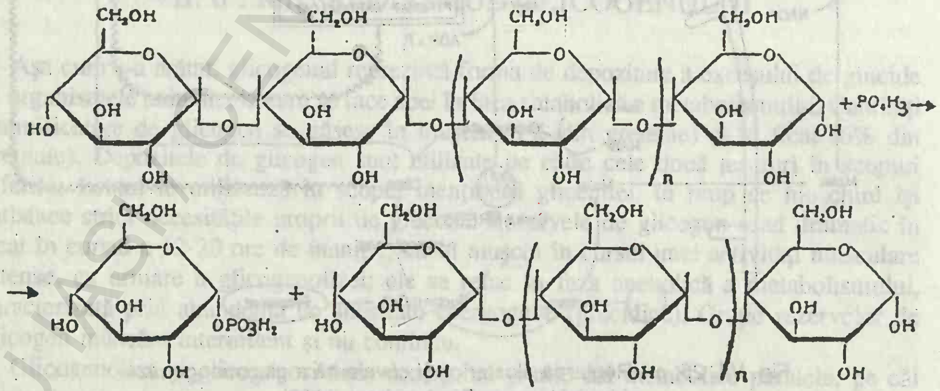


Fig. VII. 26 - Acţiunea glicogenfosforilazei asupra moleculei de glicogen

Fosforilaza nu poate să desfacă legăturile 1,6-glicozidice din molecula glicogenului, acţiunea sa încetând la o distanţă de patru resturi glucozil faţă de o ramificaţie 1,6. O altă enzimă, enzima de deramificare având activitate amilo-1,4-1,6-glucan transferazică, catalizează transferul unei unităţi trizaharidice de pe un lanţ pe un altul. În regiunea de ramificaţie rămâne un singur rest glucozil care va fi hidrolizat ulterior de aceeaşi enzimă de deramificare (enzimă bifuncţională) care manifestă şi activitate 1,6-glucozidazică (Fig. VII.27). După degradarea lanţului lateral, fosforilaza îşi continuă nestingherită acţiunea până în apropierea unui nou punct de ramificaţie.

Ca urmare a glicogenolizei rezultă glucozo-1-fosfat şi mici cantităţi de glucoză (prin acţiunea 1,6-glucozidazei). Glucozo-1-fosfatul este convertit la glucozo-6-fosfat sub acţiunea glucomutazei, enzimă necesitând drept cofactor ionul de Mg^{2+}.

Evoluţia glucozo-6-fosfatului este diferită în cele două ţesuturi ce conţin cantităţi importante de glicogen: ficatul şi muşchiul.

În ficat, glucozo-6-fosfatul este hidrolizat, sub acţiunea glucozo-6-fosfatazei, la glucoză, care va fi trimisă în circulaţie în scopul satisfacerii nevoilor energetice ale ţesuturilor glucodependente; intrarea glucozo-6-fosfatului în glicoliză este exclusă în faza catabolică a metabolismului, întrucât în această situaţie glucagonul (hormonul fazei catabolice) inhibă glicoliza prin scăderea concentraţiei de fructozo-2,6-bisfosfat, activator al 6-fosfo-fructo-1-kinazei, şi inactivarea piruvat-kinazei, pe care o converteşte la forma fosfo-inactivă.

În muşchi, ţesut lipsit de glucozo-6-fosfatază, glucozo-6-fosfatul va urma calea Embden-Meyerhof, servind ca sursă de energie pentru muşchiul însuşi. În acest ţesut, glicoliza, urmând glicogenolizei declanşată de efortul muscular, este un imperativ.

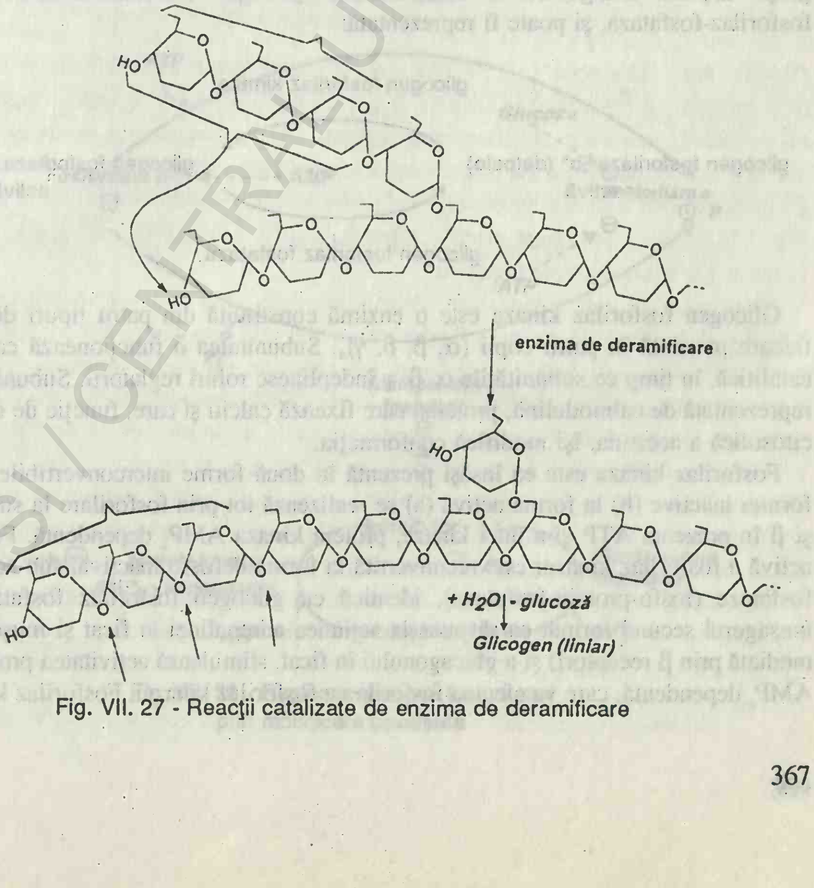


Fig. VII. 27 - Reacţii catalizate de enzima de deramificare

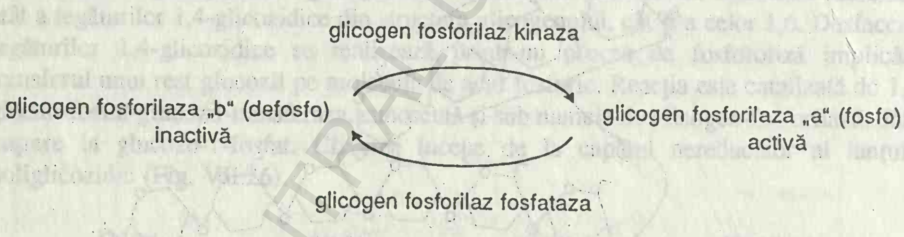
Spre deosebire de glicoliza hepatică, glicoliza musculară este activă în fază catabolică, întrucât piruvat kinaza musculară este o enzimă interconvertibilă, activă în formă fosfo, promovată de protein kinaza A, AMP_c dependentă (receptori β-adrenergici), iar activitatea 6-FF-1K nu este controlată prin fructozo-2,6-bisfosfat.

De remarcat soarta, din nou diferită a glucozei rezultată prin glicogenoliză în cele două ţesuturi. În ficat, glucokinaza, datorită valorilor K_M foarte mari, nu reconverteşte glucoza la G-6-P, ceea ce permite acesteia să iasă în sânge, în timp ce în muşchi, hexokinaza (K_M mic) operează această transformare şi G-6-P rezultat se angajează în glicoliză.

REGLAREA GLICOGENOLIZEI

Etapa limitantă de viteză în degradarea glicogenului este etapa fosforolitică. Enzima ce catalizează reacţia de fosforoliză - glicogen fosforilaza - este subordonată unui control metabolic variat şi complex, realizat atât prin reglare covalentă cât şi alosterică. Ca activator alosteric al enzimei se comportă AMP în timp ce glucozo-6-fosfatul şi ATP (concentraţii mari) sunt inhibitori alosterici ai acesteia. Activarea prin AMP se manifestă prin excelenţă în ţesutul muscular, unde concentraţia sa creşte marcat în eforturi intense şi exprimă, ca şi în cazul 6-FF-1-K, dependenţa procesului de statusul energetic celular.

Experienţele lui Cori au arătat că glicogen fosforilaza, un dimer, se găseşte în ţesuturi în două forme interconvertibile prin fosforilare-defosforilare desemnate drept „a", respectiv „b". Interconversia celor două forme ale glicogen-fosforilazei se realizează graţie acţiunii antagoniste a două enzime: glicogen fosforilaz-kinaza şi glicogen fosforilaz-fosfataza, şi poate fi reprezentată:



Glicogen fosforilaz kinaza este o enzimă constituită din patru tipuri de subunităţi fiecare prezentă în patru copii $(\alpha, \beta, \delta, \gamma)_4$. Subunitatea δ funcţionează ca subunitate catalitică, în timp ce subunităţile α, β, γ îndeplinesc roluri reglatorii. Subunitatea δ este reprezentată de calmodulină, proteină care fixează calciu şi care, funcţie de concentraţia citosolică a acestuia, îşi modifică conformaţia.

Fosforilaz kinaza este ea însăşi prezentă în două forme interconvertibile. Conversia formei inactive (b) la forma activă (a) se realizează tot prin fosforilare la subunităţile α şi β în prezenţa ATP şi a unei kinaze, protein kinaza AMP_c dependentă. Forma fosfo-activă a fosforilaz kinazei este reconvertită la forma defosfo inactivă, sub acţiunea unei fosfataze (fosfo-protein-fosfataza), identică cu glicogen fosforilaz fosfataza. AMP_c, mesagerul secund format ca răspuns la acţiunea adrenalinei în ficat şi muşchi (acţiune mediată prin β receptori) şi a glucagonului în ficat, stimulează activitatea protein kinazei AMP_c dependentă, care va efectua fosforilarea fosforilaz kinazei. Fosforilaz kinaza astfel

activată va cataliza fosforilarea glicogen fosforilazei care, activându-se, va scinda fosforolitic glicogenul. Viteza de desfăşurare a glicogenolizei va creşte deci ca urmare a acţiunii adrenalinei şi (sau) glucagonului, ale căror efecte intracelulare au fost realizate prin AMP_c. De remarcat că activarea „în cascadă" a glicogenolizei realizează o amplificare a răspunsului celulei la stimulul iniţial. Într-adevăr, eliberarea unor concentraţii mici de adrenalină (de ordinul 10^{-9} M) sau glucagon determină, printr-o amplificare succesivă în etapele catalizate enzimatic, o amplificare a glicogenolizei de 15 ordine de mărime (Fig. VII.28).

Restabilirea valorilor glicemiei deprimă secreţia de glucagon. Ca urmare a acestui fapt proteina G devine inactivă, ceea ce antrenează inactivarea adrenilat ciclazei, a protein kinazei AMP_c dependente, a fosforilaz kinazei şi glicogen fosforilazei.

De menţionat că glicogenoliza hepatică este controlată de adrenalină nu numai prin creşterea concentraţiei AMP_c, mesager secund format ca răspuns la interacţiunea hormonului cu β-receptori membranari, ci şi prin mesageri secunzi rezultaţi în urma interacţiunii adrenalinei cu receptori adrenergici de tip α_1. Această interacţiune se soldează cu formarea a doi mesageri secunzi: inozitol trisfosfatul (IP_3) şi diacilglicerolul

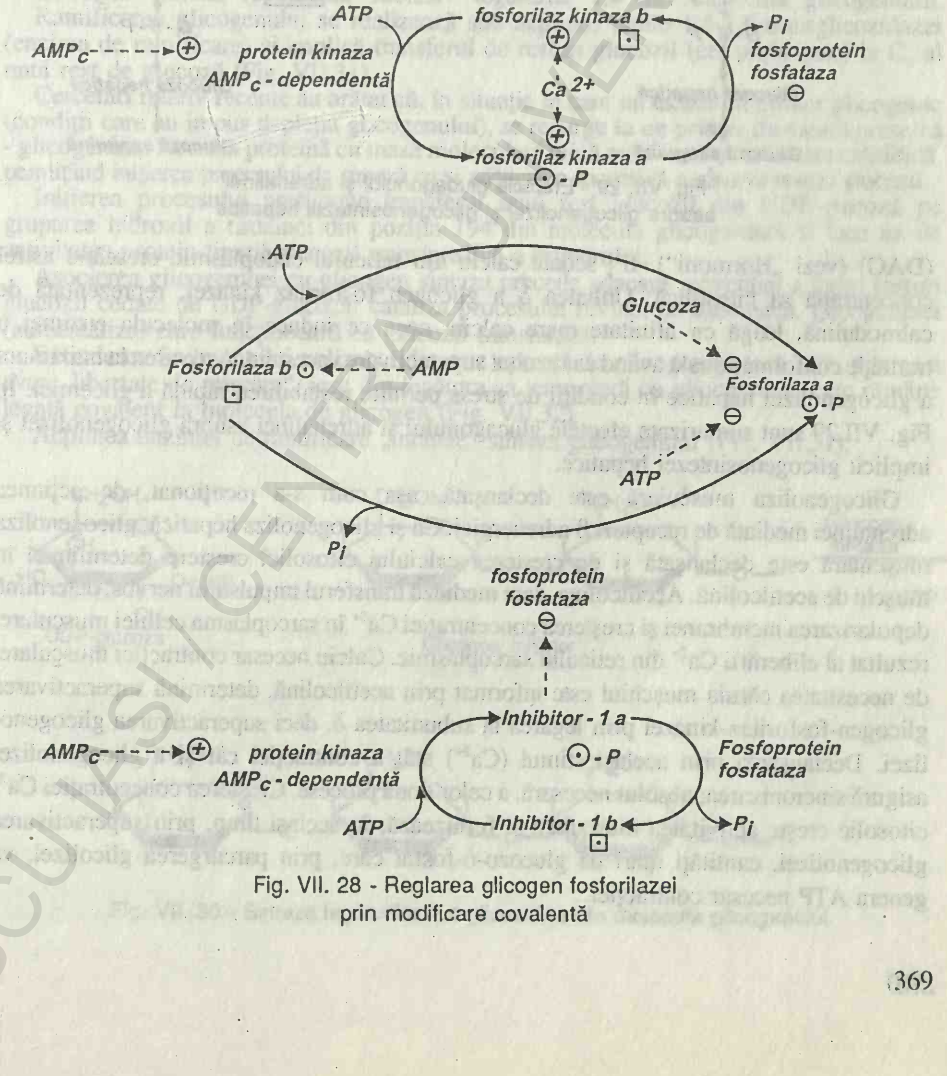


Fig. VII. 28 - Reglarea glicogen fosforilazei prin modificare covalentă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

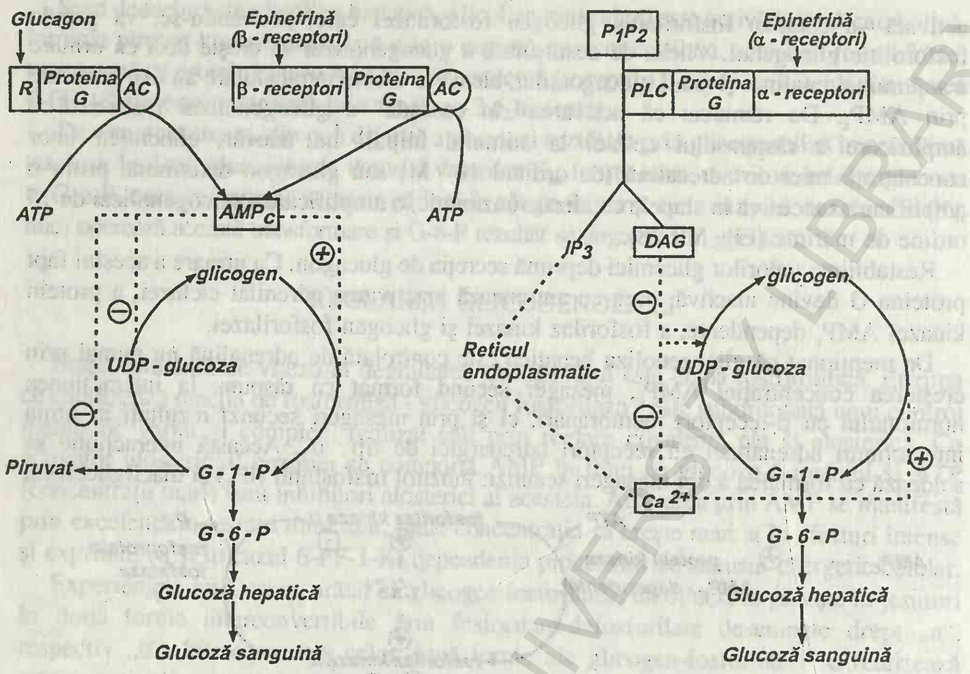


Fig. VII. 29 - Efectele glucagonului şi adrenalinei asupra glicogenolizei şi glicogenosintezei hepatice

(DAG) (vezi „Hormoni"). IP_3 scoate calciu din reticulul endoplasmic crescând astfel concentraţia sa citosolică. Unitatea δ a glicogen fosforilaz kinazei, reprezentată de calmodulină, leagă cu afinitate mare calciu, ceea ce induce în molecula enzimei o tranziţie conformaţională având ca rezultat superactivarea acesteia. Activarea la maximum a glicogenolizei hepatice în condiţii de stress permite restabilirea rapidă a glicemiei. În Fig. VII.29 sunt sumarizate efectele glucagonului şi adrenalinei asupra glicogenolizei şi implicit glicogenosintezei hepatice.

Glicogenoliza musculară este declanşată, aşa cum s-a menţionat, de acţiunea adrenalinei mediată de receptori β adrenergici. Ca şi glicogenoliza hepatică, glicogenoliza musculară este declanşată şi de creşterea calciului citosolic, creştere determinată în muşchi de acetilcolină. Acetilcolina, care mediază transferul impulsului nervos, determină depolarizarea membranei şi creşterea concentraţiei Ca^{2+} în sarcoplasma celulei musculare, rezultat al eliberării Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmic. Calciu necesar contracţiei musculare, de necesitatea căruia muşchiul este informat prin acetilcolină, determină superactivarea glicogen-fosforilaz-kinazei prin legarea la subunitatea δ, deci superactivarea glicogenolizei. Declanşarea prin acelaşi stimul (Ca^{2+}) atât a contracţiei cât şi a glicogenolizei asigură sincronizarea, absolut necesară, a celor două procese. Creşterea concentraţiei Ca^{2+} citosolic creşte activitatea musculară şi furnizează, în acelaşi timp, prin superactivarea glicogenolizei, cantităţi mari de glucozo-6-fosfat care, prin parcurgerea glicolizei, va genera ATP necesar contracţiei.

VII.6.2 BIOSINTEZA GLICOGENULUI (GLICOGENOGENEZA)

Biosinteza glicogenului din glucozo-1-fosfat implică acţiunea conjugată a unor enzime apte să realizeze legături 1,4 şi 1,6 glucozidice.Formarea unei legături glicozidice este un proces endergonic ce consumă aproximativ 4,2 kcal. Din acest motiv este necesar ca glucozo-1-fosfatul să fie mai întîi activat. Activarea se realizează, aşa cum s-a arătat (vezi calea acizilor uronici), prin conversia sa la uridin difosfat glucoză, în prezenţa UDP-glucozo-pirofosforilazei:

glucozo-1-fosfat + UTP ⟶ UDP — glucoză + PP

PP ⟶ $2P_i$

Uridin difosfat glucoza cedează un rest glucozil pe un glicogen „mic" rezultat din glicogenoliză şi care serveşte ca iniţiator (primer) al procesului de policondensare. Transferul unităţii glucozil de pe uridin difosfat glucoză pe primerul glicogenic se efectuează la capătul nereducător al oligozaharidului şi este catalizat de glicogen sintază (Fig. VII.30). Energia eliberată la sinteza unei legături 1,4 glicozidice, prin transferul glucozei de pe uridin difosfat glucoză, este de aproximativ 3kcal, deci reacţia este termodinamic avantajoasă sintezei (la hidroliza pirofosfatului $\Delta G^{\circ\prime} = -7$ kcal).

Glicogen sintaza realizează, exclusiv legăturile 1,4 din molecula glicogenului. Ramificarea glicogenului se realizează sub acţiunea amilo-1,4-1,6-transglicozidazei (enzima de ramificare) şi implică transferul de resturi glucozil (cel puţin şase) la C_6 al unui rest de glucoză (Fig. VII.31).

Cercetări relativ recente au arătat că, în situaţia în care nu există un primer glicogenic (condiţii care au impus depleţia glicogenului), se recurge la un primer de natură proteică - glicogenina. Această proteină cu masă moleculară mică manifestă şi activitate catalitică, permiţând iniţierea procesului de sinteză ca şi adăugarea succesivă a câtorva resturi glucozil.

Iniţierea procesului presupune transferul unui rest glucozil din UDP-glucoză pe gruparea hidroxil a tirozinei din poziţia 194 din molecula glicogeninei şi face uz de activitatea protein-tirozil-glucozil transferazică a primerului.

Asocierea glicogeninei cu glicogen sintaza precede adaosul secvenţial a şapte resturi glucozil cedate de UDP-glucoză; cataliza procesului revine, de asemenea, glicogeninei (autocataliză) care funcţionează ca glucozil transferază.

Extinderea fragmentului polizaharidic este operată de glicogen sintază care, pentru a avea „libertate de mişcare", iese din legătura sa temporară cu glicogenina, care rămâne legată covalent la molecula de glicogen (Fig. VII.32).

Acţiunea enzimei de ramificare „încheie" sinteza glicogenului (Fig. VII.31).

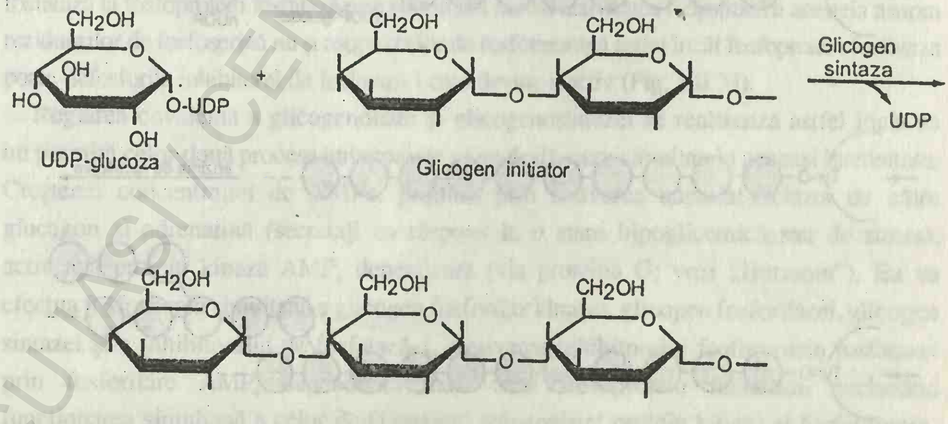


Fig. VII. 30 - Sinteza legăturilor 1,4 glicozidice din molecula glicogenului

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

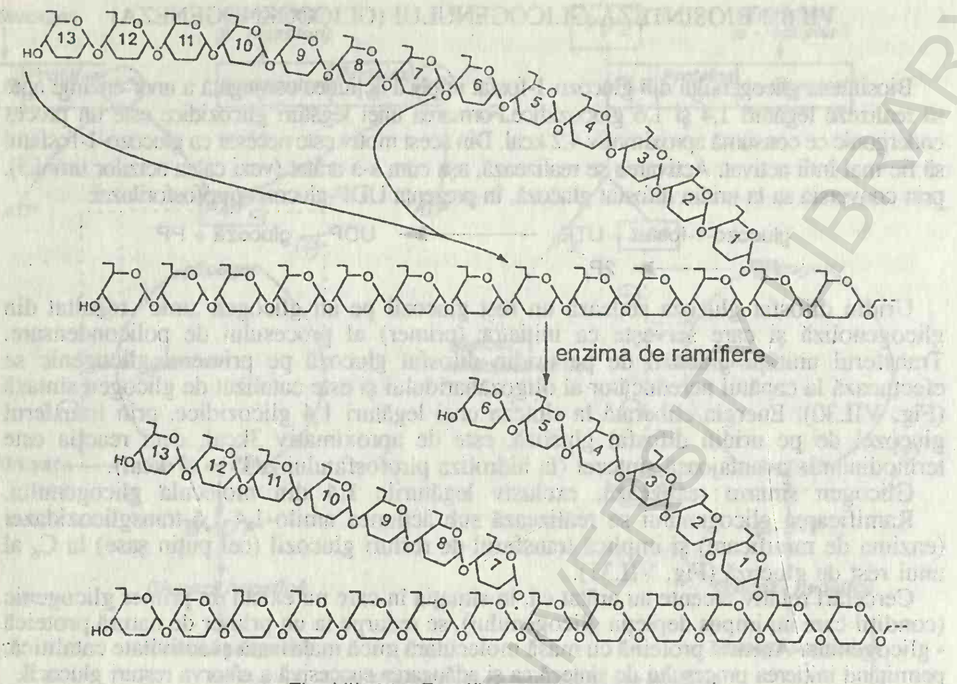


Fig. VII. 31 - Ramificarea glicogenului

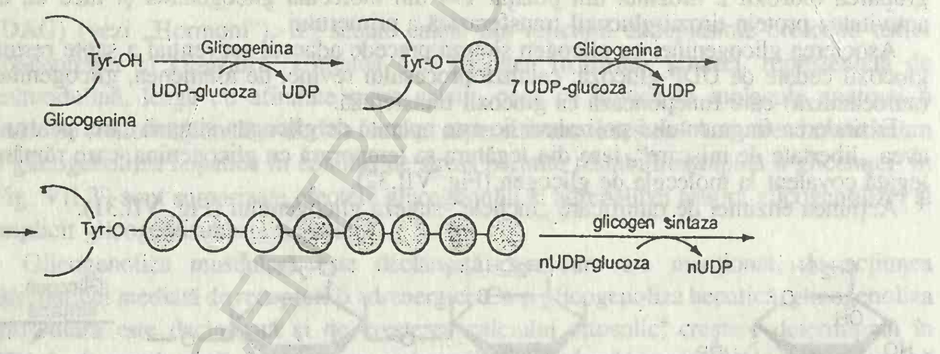
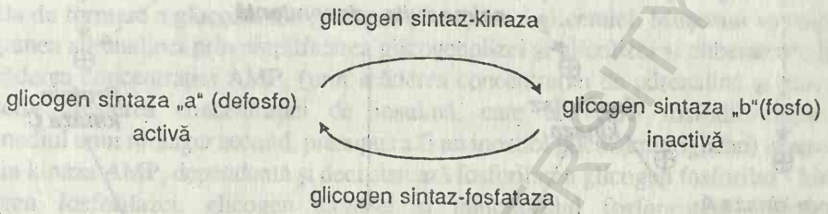


Fig. VII. 32 - Sinteza glicogenului foloseşte ca primer o proteină cu activitate catalitică - glicogenina

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

REGLAREA GLICOGENOGENEZEI

Enzima limitantă de viteză a glicogenosintezei, la nivelul căreia se exercită un control metabolic riguros, este glicogen sintaza. Ca şi glicogen fosforilaza, glicogen sintaza se prezintă sub două forme interconvertibile prin fosforilare - defosforilare. Forma fosforilată „b" este inactivă în timp ce cea defosforilată „a" este activă. Interconversia celor două forme ale glicogen sintazei se realizează, esenţial, graţie acţiunii antagoniste a două enzime: glicogen-sintaz-kinaza şi glicogen-sintaz-fosfataza:



Glicogen sintaz-kinaza AMP_c dependentă este identică cu protein kinaza AMPc dependentă care activează, prin fosforilare, glicogen fosforilaz kinaza. Glicogen sintaz-fosfataza este identică cu glicogen fosforilaz kinaz fosfataza şi cu glicogen fosforilaz fosfataza. Această fosfo-protein-fosfatază realizează prin defosforilare activarea glicogen-sintazei şi inactivarea simultană a glicogen fosforilaz kinazei şi glicogen fosforilazei.

O măsură adiţională pe care o ia celula pentru a evita desfăşurarea simultană a defosforilării cu fosforilarea constă în inactivarea fosfo-protein-fosfatazei de către o proteină - inhibitorul de fosfatază-1 - care devine activ prin fosforilare AMP_c dependentă (ca şi glicogen fosforilaz kinaza şi glicogen fosforilaza), fosforilare realizată însă la un reziduu de treonină şi nu de serină, ca în celelalte cazuri. Prin legarea inhibitorului de fosfatază la fosfoprotein fosfatază este suprimată numai activitatea hidrolitică a acesteia asupra reziduurilor de fosfoserină nu şi asupra celor de fosfotreonină astfel încât fosfoprotein fosfataza poate defosforila inhibitorul de fosfatază-l care devine inactiv (Fig. VII.33).

Reglarea covalentă a glicogenolizei şi glicogenosintezei se realizează astfel incât să nu permită celor două procese antagoniste să se desfăşoare simultan la aceeaşi intensitate. Creşterea concentraţiei de AMPc, produsă prin activarea adenilat-ciclazei de către glucagon şi adrenalină (secretaţi ca răspuns la o stare hipoglicemică sau de stress), activează protein kinaza AMP_c dependentă (via proteina G; vezi „Hormoni"). Ea va efectua fosforilarea simultană a glicogen fosforilaz kinazei, glicogen fosforilazei, glicogen sintazei şi a inhibitorului de fosfatază-1. Activarea inhibitorului fosfoprotein fosfatazei prin fosforilare AMP_c dependentă inactivează fosfoprotein fosfataza, excluzând funcţionarea simultană a celor două enzime antagoniste: protein kinaza şi fosfoprotein

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

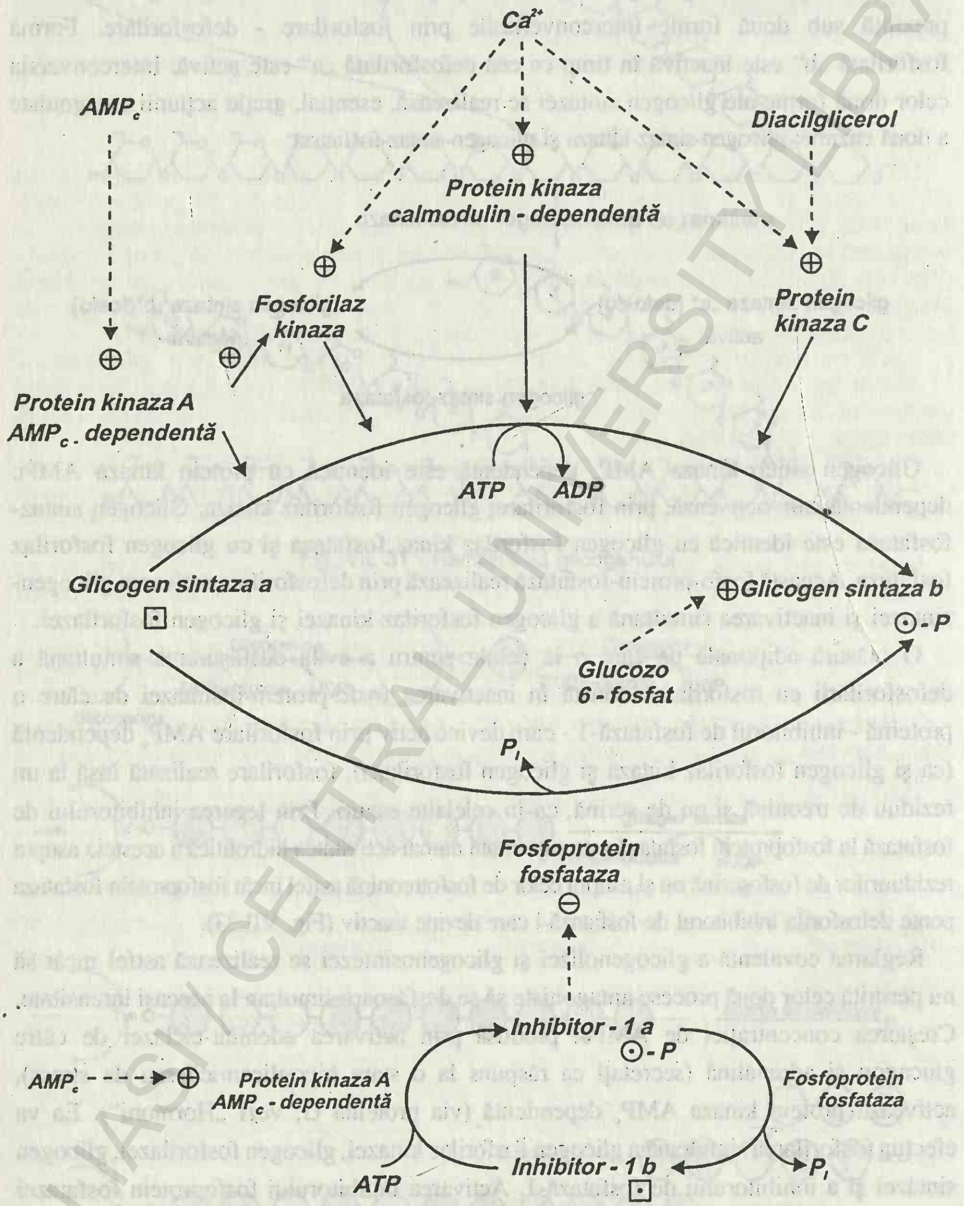


FIG. VII - 33 Reglarea glicogen sintazei prin modificare covalentă(După Devlin)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fosfataza. Glicogen fosforilaz kinaza şi glicogen fosforilaza în formă fosfo vor declanşa procesul de glicogenoliză ca răspuns la stimulul hormonal. În acelaşi timp, sinteza glicogenului este suprimată, întrucât glicogen sintaza se inactivează prin fosforilare (Fig. VII.34).

De menţionat că glicogen sintaza este inhibată prin fosforilare nu numai de către protein kinaza A, AMP_c dependentă, ci şi de către alte kinaze, activate de alţi mesageri secunzi, cum ar fi de exemplu protein kinaza C activată sinergic de Ca^{2+} şi DAG. Evident, inactivarea glicogen sintazei de către protein kinaza C este complementară acţiunii de stimulare a glicogen fosforilaz kinazei prin Ca^{2+} (via IP_3). Suprimarea sintezei de glicogen în perioadele de glicogenoliză activă se asigură şi prin fosforilarea glicogen sintazei de către glicogen fosforilaz kinaza superactivă, care a legat Ca^{2+}.

Efectul net al acţiunii hormonilor ce cresc concentraţia de AMP_c asupra ficatului va fi acela de formare a glucozei din glicogen şi creştere a glicemiei. Muşchiul va răspunde la acţiunea adrenalinei prin amplificarea glicogenolizei şi glicolizei şi eliberare de lactat.

Scăderea concentraţiei AMP_c (prin scăderea concentraţiei de adrenalină şi glucagon, respectiv creşterea concentraţiei de insulină, care activează fosfodiesteraza prin intermediul unui mesager secund, presupus a fi un inozitol glicozaminoglican) inactivează protein kinaza AMP_c dependentă şi deci sistează fosforilarea glicogen fosforilaz - kinazei, glicogen fosforilazei, glicogen sintazei şi inhibitorului fosfoprotein fosfatazei-1. Inhibitorul de fosfatază 1, devenit inactiv, permite acţiunea fosfoprotein fosfatazei care defosforilează cele trei enzime implicate în metabolismul glicogenului. Ca urmare, glicogen sintaza se activează, în timp ce glicogen fosforilaz kinaza şi glicogen fosforilaza se inactivează, ceea ce se traduce prin creşterea vitezei de sinteză a glicogenului şi deprimarea glicogenolizei.

Efectul net al hormonilor care scad concentraţia de AMP_c asupra ficatului va fi acela de stimulare a glicogenosintezei şi deci de scădere a glicemiei.

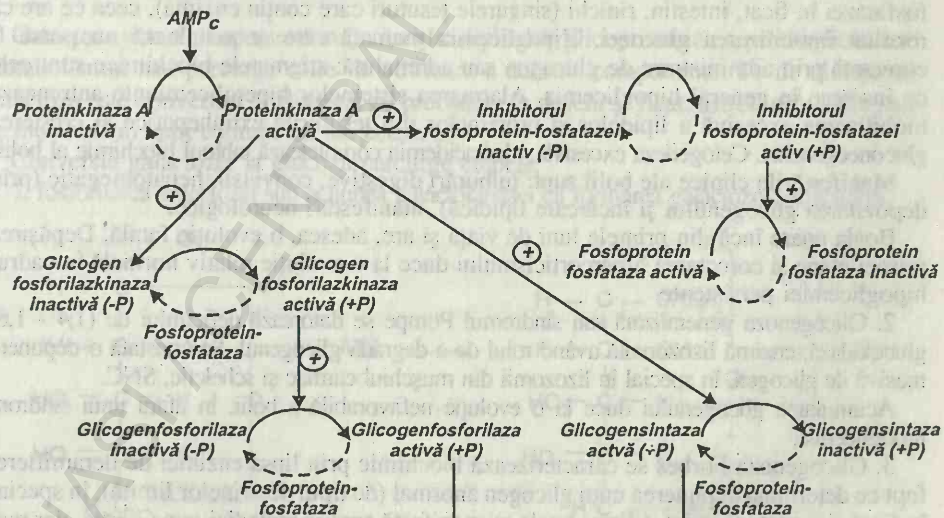


Fig. VII. 34 - Activarea glicogenolizei coincide cu inactivarea glicogenosintezei

Cercetări recente duc la concluzia că, ficatul are abilitatea de a răspunde direct la concentrații mari de glucoză în sânge (postprandial) prin inactivarea glicogen fosforilazei şi activarea glicogen sintazei, în afara unei medieri hormonale.

Glucoza hepatică se comportă ca inhibitor alosteric al glicogen fosforilazei inducând în aceasta o modificare conformațională soldată cu expunerea reziduurilor de fosfoserină la acțiunea fosfoprotein fosfatazei care o defosforilează, inactivând-o.

Defosforilarea glicogen fosforilazei „a", acompaniată de conversia la glicogen fosforilaza „b", permite eliberarea fosfoprotein fosfatazei din complexul pe care aceasta îl formează exclusiv cu glicogen fosforilaza „a". Ca urmare, glicogen sintaza devine ținta acțiunii fosfoprotein fosfatazei care o defosforilează, activând-o.

Inhibiția glicogenolizei prin concentrația de glucoză sanguină, respectiv de glucoză hepatică liberă, şi activarea simultană a glicogenosintezei, prin mecanismul descris, desemnează glicogen fosforilaza ca senzor de glucoză.

De remarcat că însăşi natura efectorului alosteric pentru cele două glicogen fosforilaze - glucoza - efector negativ pentru glicogen fosforilaza hepatică şi AMP - efector pozitiv redutabil pentru glicogen fosforilaza musculară - este expresia scopului diferit al glicogenolizei hepatice (restabilirea glicemiei) față de cea musculară (asigurarea ATP necesar contracției).

VII.6.3. ALTERĂRI ENZIMATICE ÎN METABOLISMUL GLICOGENULUI

Se cunosc numeroase situații patologice caracterizate prin deficiența ereditară a sistemelor enzimatice implicate în metabolismul glicogenului. Aceste deficiențe antrenează depunerea unor cantități masive de glicogen, motiv pentru care au fost reunite sub numele de boli de depozitare a glicogenului sau glicogenoze. Au fost descrise până acum nouă tipuri de glicogenoze:

1. Glicogenoza hepato-renală sau boala von Gierke reprezintă cel mai frecvent tip de glicogenoză. Boala se caracterizează printr-o activitate redusă sau prin absența glucozo-6-fosfatazei în ficat, intestin, rinichi (singurele țesuturi care conțin enzima), ceea ce are ca rezultat imobilizarea glucozei. Hipoglicemia marcată care se instalează nu poate fi corectată prin administrare de glucagon sau adrenalină; stigmatele biochimice sunt cele ce însoțesc în general hipoglicemia. Alarmarea sistemelor hiperglicemiante antrenează mobilizarea excesivă a lipidelor şi proteinelor din țesuturile extrahepatice şi creşterea gluconeogenezei. Cetogeneza excesivă şi lactacidemia completează tabloul biochimic al bolii.

Manifestările clinice ale bolii sunt: tulburări digestive, convulsii, hepatomegalie (prin depozitarea glicogenului şi încărcare lipidică), manifestări neurologice.

Boala apare încă din primele luni de viață şi are, adesea, o evoluție fatală. Depăşirea primei etape şi corectarea hipercorticismului duce la o evoluție relativ normală în cadrul hipoglicemiei persistente.

2. Glicogenoza generalizată sau sindromul Pompe se datorează deficitului de (1,4 - 1,6) glucozidază, enzimă lizozomală având rolul de a degrada glicogenul. Se constată o depunere masivă de glicogen, în special în lizozomii din muşchiul cardiac şi scheletic, SNC.

Acumularea glicogenului duce la o evoluție nefavorabilă a bolii, în afara unui sindrom hipoglicemic.

3. Glicogenoza Forbes se caracterizează biochimic prin lipsa enzimei de deramifiere, fapt ce determină depunerea unui glicogen anormal (de tipul dextrinelor limită), în special în ficat şi muşchiul striat. Clinic, boala se manifestă analog maladiei von Gierke, dar mai atenuată.

4. Glicogenoza Anderson este determinată de deficiența enzimei de ramifiere - amilo - (1,4 - 1,6)-transglucozidaza. În ficat, splină, intestin se depune un glicogen cu lanțuri

extrem de scurte. Boala se manifestă clinic prin ciroză şi evoluţia este fatală în jurul vârstei de 10 ani, deşi glicemia se menţine în limite normale.

5. Glicogenoza Mc Ardle se datorează deficienţei fosforilazei musculare şi duce la depuneri masive de glicogen normal. Cum muşchiul în repaos foloseşte drept combustibil acizii graşi şi corpii cetonici, preferenţial faţă de glucoza sanguină, boala se manifestă numai în cursul efortului muscular. Crampele, durerile, oboseala musculară sunt rezultatul incapacităţii muşchiului de a folosi glicogenul propriu, principala sursă de glucoză în condiţii de efort. Ciclul Cori este profund perturbat, ca urmare a fenomenului descris.

6. Glicogenoza Hers se caracterizează prin diminuarea activităţii fosforilazei hepatice, ceea ce antrenează depuneri masive de glicogen normal în ficat. Hipoglicemia nu este foarte severă. Maladia Hers se manifestă, de asemenea, ca o formă atenuată a maladiei von Gierke. Unii autori consideră drept cauză primară a acestui tip de glicogenoză o anomalie în activitatea adenilat ciclazei, incapabilă să asigure o concentraţie adecvată de AMP_c.

7. Glicogenoza de tip 7 reprezintă forma maladiei Hers în care, concomitent cu depozitarea excesivă de glicogen în ficat, se constată şi o încărcare musculară.

8. A fost descrisă o glicogenoză de tip 8, având drept cauză absenţa glucagonului, activator al fosforilazei.

9. Hug a pus în evidenţă glicogenoze datorate deficitului unor sisteme enzimatice responsabile de activarea fosforilazei, cum ar fi fosforilaz-kinaza (glicogenoza de tip 9).

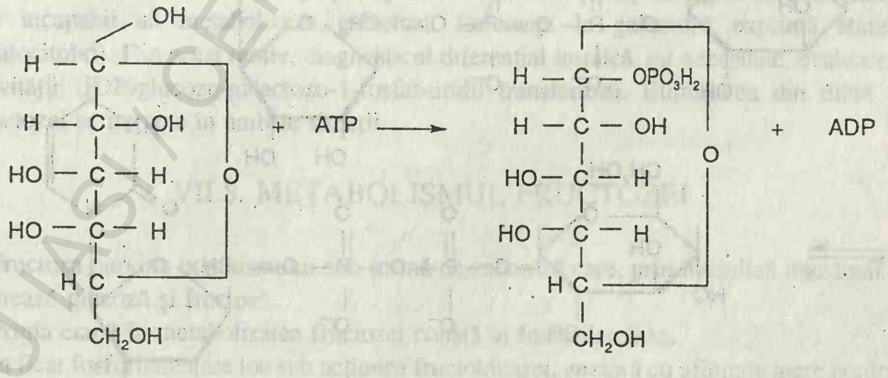
Există posibilitatea ca unele tipuri de glicogenoze să apară asociate, ceea ce complică diagnosticarea şi tratamentul acestora.

VII.7. METABOLISMUL GALACTOZEI

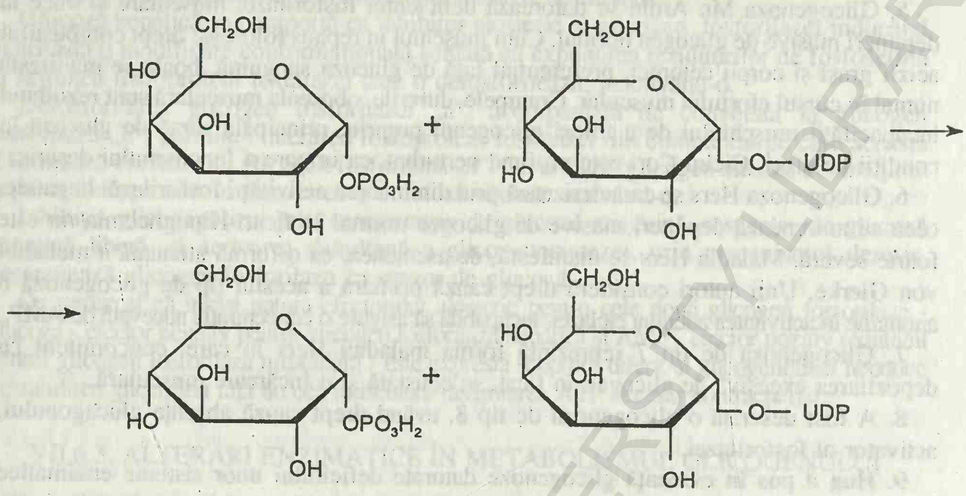
Galactoza este o componentă majoră a glicolipidelor, glicoproteinelor, proteoglicanilor. Metabolismul său parcurge căile de edificare a acestor componente. Pe de altă parte, galactoza este convertită la glucoză, cu precădere în rinichi şi ficat, astfel încât căile sale de metabolism sunt comune cu ale acesteia.

Conversia galactozei la glucoză parcurge etapele:

1. fosforilarea galactozei sub acţiunea galactokinazei cu formarea galactozo-1-fosfatului:



2. Transferul restului galactozil pe uridin difosfat-glucoză (UDP-glucoză) sub acţiunea UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat-uridil transferazei:

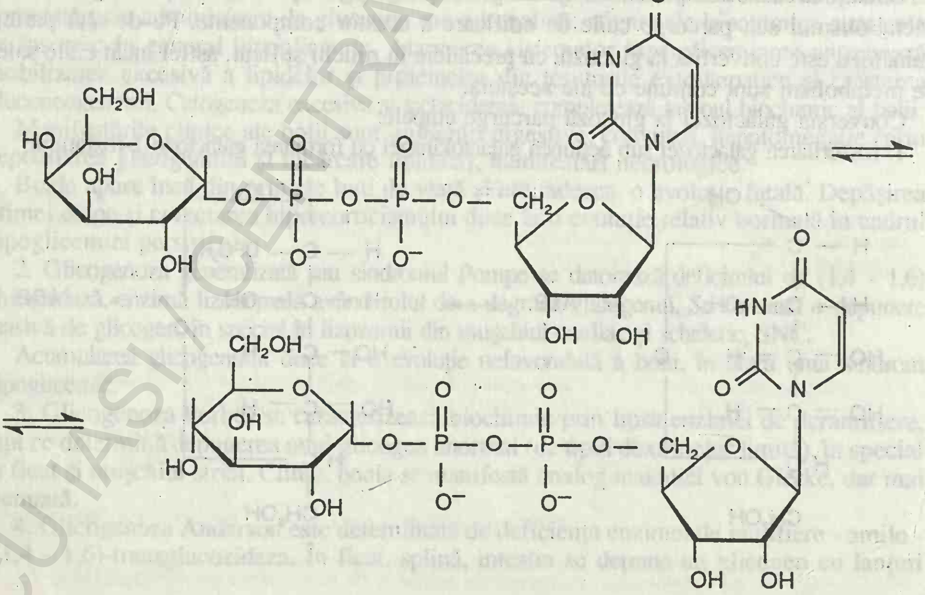


UDP-galactoza se formează parţial şi prin reacţia:

$$UTP + gal\text{-}1\text{-}fosfat \longrightarrow UDP\text{-}gal + PP_i$$

Activitatea UDP-galactozo-pirofosforilazei, enzima ce catalizează reacţia de mai sus, scade cu vârsta, astfel încât ea nu se poate substitui UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat uridil transferazei.

3. Interconversia celor două oze se produce la nivelul nucleozid-difosfaţilor şi presupune inversia grupei - OH de la C_4 (epimerizare la C_4). Reacţia este catalizată de o epimerază (UDP-glucozo-4-epimerază).

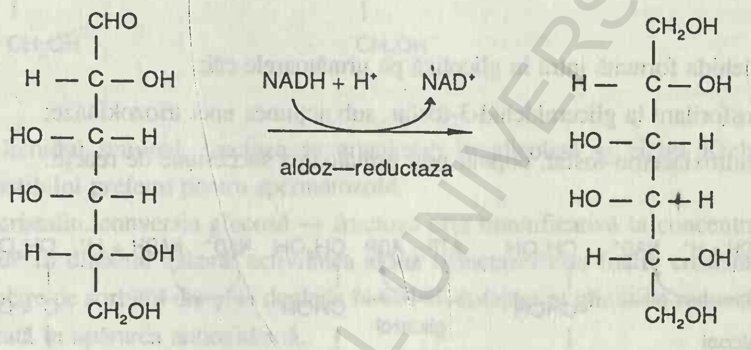


BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Echilibrul UDP-Gal ⇄ UDP-Gluc este dominat de nevoile organismului la un moment dat. În perioadele de lactaţie, când glanda mamară sintetizează mari cantităţi de lactoză, în perioadele de formare a structurilor glicolipidice (mielină), echilibrul este favorabil formării galactozei. Interconversia UDP-Gal ⇄ UDP-Gluc face ca prezenţa galactozei să nu fie obligatorie în dietă.

UDP-glucoza poate constitui precursorul imediat al sintezei de glicogen sau poate fi scindată la glucozo-1-fosfat (UDP-Gluc + PP → UTP + Gluc-1-fosfat), sub acţiunea UDP-glucozo-pirofosforilazei.

Metabolismul galactozei poate fi blocat în anomalia genetică a enzimelor implicate în conversia sa la glucoză. Deficienţa galactokinazei duce la galactozemie şi galactozurie şi se manifestă clinic prin apariţia cataractei. În instalarea cataractei un rol important revine reducerii galactozei, acumulată în cristalin, la poliolul corespunzător, sub acţiunea aldoz-reductazei (prin efectul osmotic al acestui poliol).



Galactoza Galactitol

Mult mai severă este deficienţa UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat-uridil transferazei, întrucât acumularea de galactozo-1-fosfat în ficat duce la sechestrarea fosfatului sub forma acestui ester. Stigmatele clinice ale bolii sunt: alterări hepatice, cataractă, tulburări neuropsihice. Modificări analoage pot apărea în insuficienţa hepatică gravă, când ficatul este incapabil să metabolizeze galactoza (toleranţa la galactoză exprimă starea hepatocitului). Din acest motiv, diagnosticul diferenţial implică, cu necesitate, evaluarea activităţii UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat-uridil transferazei. Eliminarea din dietă a galactozei se impune în ambele situaţii.

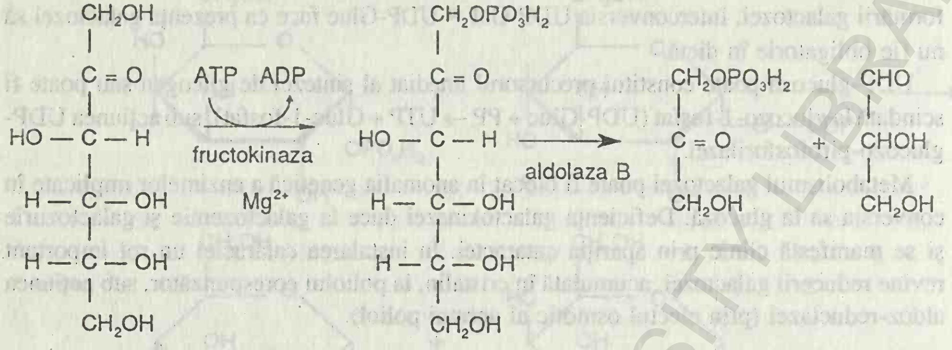
VII.8. METABOLISMUL FRUCTOZEI

Fructoza parvine organismului sub formă de zaharoză care, prin hidroliză intestinală, formează glucoză şi fructoză.

Prima etapă în metabolizarea fructozei constă în fosforilarea sa.

În ficat fosforilarea are loc sub acţiunea fructokinazei, enzimă cu afinitate mare pentru fructoză, necontrolată de insulină.

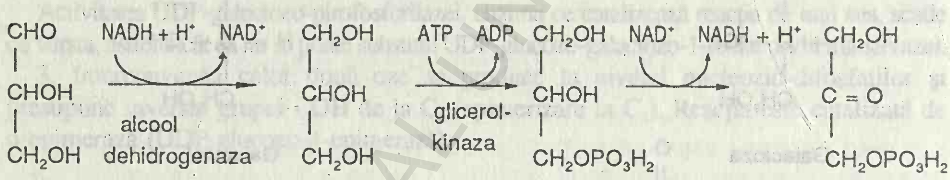
Fructozo-1-fosfatul rezultat este scindat sub acţiunea aldolazei B, enzimă prezentă exclusiv în ficat, la două trioze: gliceraldehida şi dihidroxiacetonfosfatul.



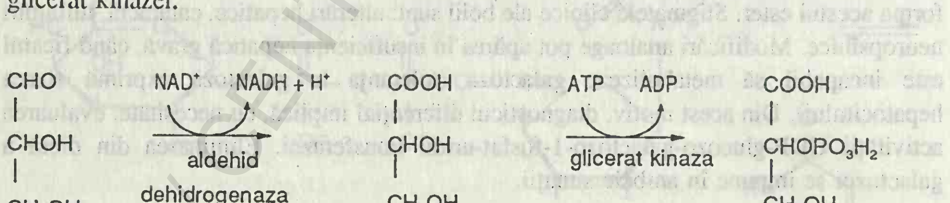
Gliceraldehida formată intră în glicoliză pe următoarele căi:

a. prin fosforilare la gliceraldehid-3-fosfat, sub acţiunea unei triozokinaze;

b. ca dihidroxiaceton-fosfat, obţinut prin următoarea succesiune de reacţii:



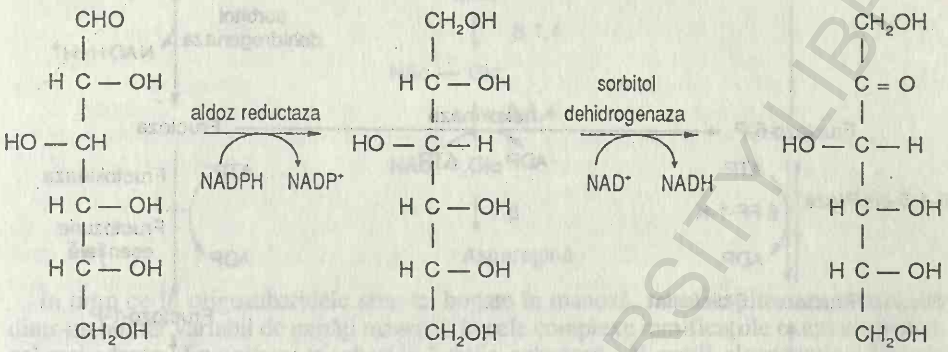
c. ca 2-fosfoglicerat, obţinut prin acţiunea aldehid dehidrogenazei urmată de acţiunea glicerat kinazei:



Oricare dintre aceşti compuşi poate parcurge calea glicolitică spre piruvat sau, în funcţie de necesităţile celulei, poate genera glucoză. De remarcat că fructoza se sustrage controlului exercitat de către enzima limitantă de viteză a glicolizei, 6-FF-1K, ceea ce-i permite să alimenteze necontrolat neolipogeneza cu substrate şi să aibă, în consecinţă, acţiune aterogenă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În veziculele seminale ca şi în cristalin fructoza se obţine din glucoză pe calea poliolică, care presupune acţiunea conjugată a două enzime: aldoz reductaza NADPH dependentă şi sorbitol dehidrogenaza NAD dependentă:



În lichidul seminal, fructoza se angajează în glicoliză şi ciclul Krebs, ea fiind combustibilul preferat pentru spermatozoid.

În cristalin, conversia glucoză → fructoză este semnificativă la concentraţii mari de glucoză. În diabetul zaharat activitatea aldoz reductazei este foarte crescută ducând la acumulare de sorbitol dar şi la depleţia NADPH, cofactor al glutation reductazei, enzimă implicată în apărarea antioxidantă.

Incapabil să traverseze membrana cristalinului, sorbitolul contribuie la instalarea retinopatiei şi cataractei diabetice prin modificările osmotice şi, probabil, prin deprimarea statusului antioxidant celular.

Considerat o „toxină tisulară", sorbitolul, produs al căii poliolice, contribuie şi la patogeneza neuropatiei şi nefropatiei diabetice, alături de perturbarea metabolismului fosfatidil - inozitolilor şi activităţii Na^+, K^+, ATP-azei.

Inhibarea căii poliolice previne atât instalarea cataractei şi retinopatiei cât şi dezechilibrele menţionate mai sus (în diabetul experimental).

Evoluţiile metabolice posibile pentru fructoză sunt reprezentate în Fig. VII. 35.

Deficienţa ereditară a aldolazei B duce la intoleranţă ereditară la fructoză. Acumularea de fructozo-1-fosfat inhibă glucozo-6-fosfataza şi glicogen fosforilaza şi deci glucoza este sechestrată în ficat ca ester fosforic, ceea ce explică crizele hipoglicemice.

În muşchi şi rinichi fructoza este convertită la fructozo-6-fosfat prin acţiunea hexokinazei. Deficienţa ereditară a enzimei duce la acumularea de fructoză în sânge, urmată de eliminare (fructozurie esenţială).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

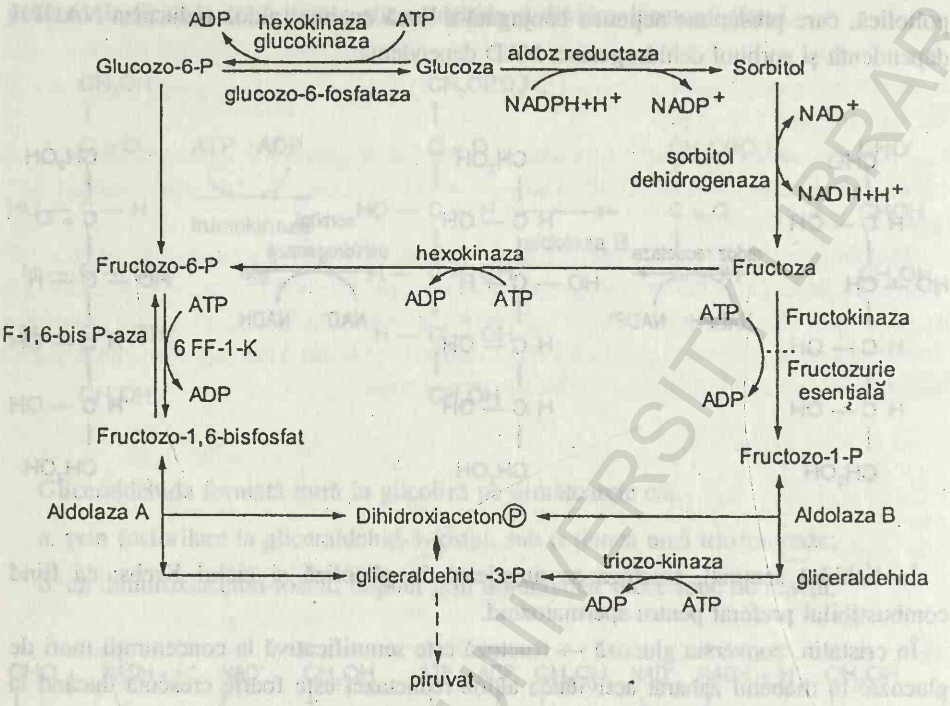


Fig. VII. 35 - Evoluţii metabolice posibile pentru fructoză

VII.9. GLICOPROTEINELE

Glicoproteinele reprezintă o clasă de proteine rezultate prin legarea covalentă la lanţurile polipeptidice a unor fragmente oligozaharidice liniare sau ramificate, de dimensiuni variabile. Conţinutul glucidic al glicoproteinelor variază între 1 şi 80% din masa moleculei.

Monozaharidele care intră în structura glicoproteinelor sunt: galactoza, manoza, fucoza, acidul sialic, galactozamina, glucozamina, arabinoza şi xiloza. Numărul de unităţi monozaharidice în fragmentele oligozaharidice variază între minimum 3 şi maximum 15.

Legăturile dintre fragmentele oligozaharidice şi proteine sunt legături de tip N- sau O-glicozidic şi se stabilesc fie prin azotul amidic al asparaginei, fie prin grupările hidroxil ale serinei, treoninei, hidroxilisinei, hidroxiprolinei.

La formarea legăturii N- sau O-glicozidice participă cu precădere N-acetil-glucozamina şi N-acetil-galactozamina.

Cealaltă extremitate a lanţului oligozaharidic este reprezentată în special de acidul sialic.

Legătura N-glicozidică este cea mai frecventă şi utilizează ca monozaharid de legătură N-acetil-glucozamina (N Ac Glc).

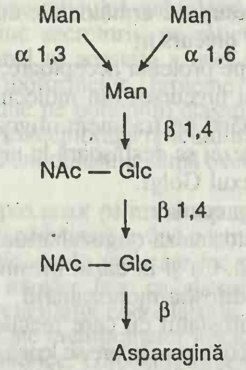
Există două tipuri principale de oligozaharide N-glicozidice:

– simple – conţinând exclusiv N-acetil-glucozamină (N Ac Glc) şi un număr relativ mare de unităţi manozil;

– complexe – care, pe lângă N-acetil-glucozamină şi manoză, conţin acid sialic, galactoză, N-acetil-galactozamină (N Ac Gal).

BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Ambele categorii conţin o regiune comună, „un miez“, reprezentat de succesiunea a trei resturi de manoză şi două de N Ac-Glc legate la asparagină:



În timp ce în oligozaharidele simple, bogate în manoză, ramificaţiile sunt constituite dintr-un număr variabil de unităţi manozil, în cele complexe ramificaţiile externe constau, cel mai adesea, din unitatea trizaharidică sialic-galactoză - N-acetil-glucozamină. Un rest fucozil se leagă uneori la restul N-acetil-glucozamină din „miezul“ oligozaharidic. În Fig. VII.36 este reprezentată structura unui oligozaharid simplu, bogat în manoză (a) (izolat din tireoglobulina bovină) şi a unui oligozaharid complex (b).

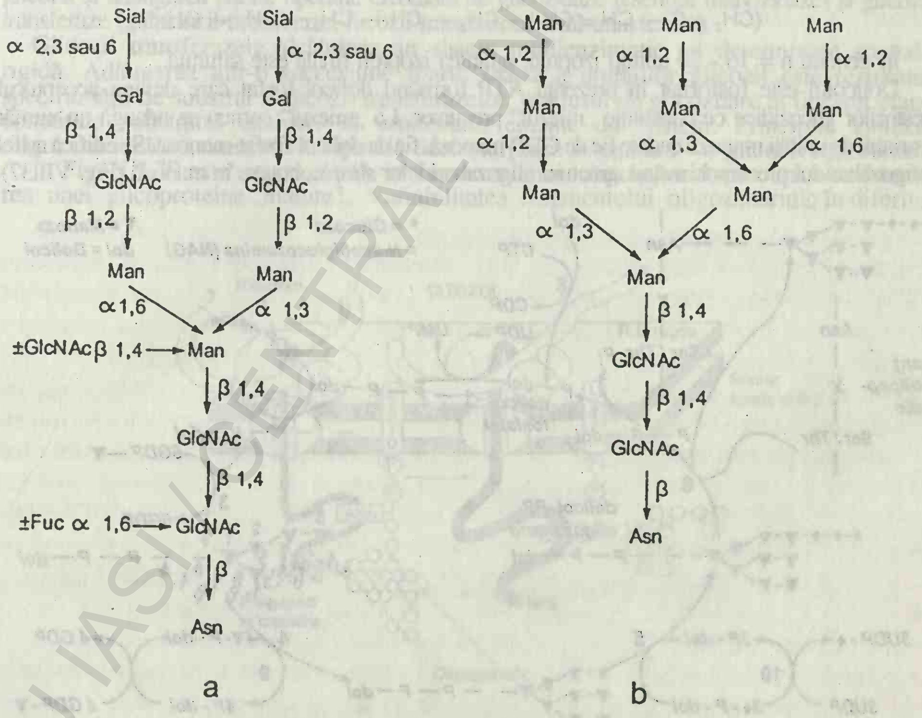


Fig. VII. 36 - Structura unui oligozaharid simplu, bogat în manoză (a) şi a unui oligozaharid complex (b)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII. 9.1. BIOSINTEZA GLICOPROTEINELOR

Biosinteza glicoproteinelor presupune următoarele etape:

1. formarea unui oligozaharid precursor;
2. transferul oligozaharidului pe proteina acceptoare;
3. prelucrarea oligozaharidului precursor din molecula glicoproteinelor, cu formarea glicoproteinelor „mature", conținând un fragment oligozaharidic specific.

Primele două etape ale biosintezei se desfăşoară la nivelul reticulului endoplasmic, în timp ce ultima are loc în complexul Golgi.

1. Formarea oligozaharidului precursor.

Monozaharidele iau parte la biosinteza oligozaharidelor, atât a celor precursor, cât şi a celor „mature", în stare activată. Ca şi în cazul biosintezei glicogenului, forma activă este reprezentată de nucleozid-difosfat-monozaharid. Monozaharidele arată oarecare specificitate față de nucleozid-trifosfatul cu care reacționează. Astfel, α glucoza şi α-galactoza, ca şi N-acetil-ozaminele corespunzătoare se leagă de CMP. Oligozaharidul precursor este un oligozaharid simplu (conținând exclusiv N-acetil-glucozamină şi manoză) ce rezultă prin transferul succesiv al ozelor activate pe un alcool gras care poartă numele de dolicol. Molecula de dolicol, care este un poliizoprenol, este puternic hidrofobă şi are o lungime de aproximativ 10 nm, ceea ce îi permite să străbată de mai multe ori dublul strat lipidic al membranei reticulului endoplasmic (fața luminală) în care este ancorat:

$$(CH_2 = \overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}} - CH = CH)_n - CH_2 - \overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}H} - CH_2 - CH_2 - OH$$

În general n = 16 - 20 unități izopren; unitatea izopren finală este saturată.

Dolicolul este fosforilat în prezența ATP formând dolicol fosfat care devine acceptorul resturilor glicozidice ce constituie „miezul" precursor. La „miezul" comun se adaugă un număr variabil de unități manozil cedate fie de GDP-manoză, fie de dolicol-fosfat-manoză. Se edifică astfel oligozaharidul precursor, având structura oligozaharidelor simple, bogate în manoză (Fig. VII.37).

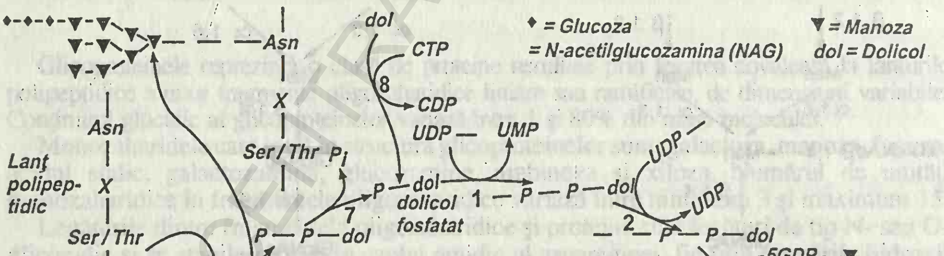


Fig. VII: 37 - Sinteza oligozaharidului precursor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De remarcat că oligozaharidul se leagă de dolicol printr-o legătură pirofosfat care îl activează, facilitând transferul său ulterior pe proteină. Proteinele ce urmează a fi glicozilate pentru a da naştere glicoproteinelor sunt sintetizate, ca toate proteinele secretorii, pe ribozomii ancoraţi pe reticulul endoplasmic (RE). Ancorarea unui ribozom, implicat în sinteza unei proteine secretorii, pe reticulul endoplasmic este decisă de prezenţa la capătul aminoterminal al acesteia a unei secvenţe semnal, complementară unui domeniu din molecula riboforinelor, proteine transmembranare ale reticulului endoplasmic. Proteinele sintetizate pe polizomii ataşaţi străbat tunelul subunităţii mari a ribozomului, tunel ce se extinde în membrana reticulului endoplasmic. Lanţul polipeptidic îşi continuă creşterea în reticulul endoplasmic după excizia secvenţei semnal sub acţiunea unei peptidaze specifice.

2. Transferul oligozaharidului precursor pe restul asparagină al proteinei este catalizat de o oligozaharid-transferază, enzimă membranară având centrul activ orientat spre faţa luminală a membranei reticulului endoplasmic, acolo unde are loc glicozilarea (Fig. VII. 38). Această orientare spaţială a enzimei de transfer face ca glicozilarea să fie atributul exclusiv al proteinelor ce intră în lumenul reticulului endoplasmic, respectiv al proteinelor de export şi al celor destinate a fi proteine ale membranelor intracelulare (lizozomale, nucleare, ale reticulului endoplasmic) şi plasmatice. Glicozilarea se efectuează numai pe reziduuri de asparagină integrate secvenţelor Asn-Aa-Ser sau Asn-Aa-Thr, secvenţe rar întâlnite în glicoproteine, tocmai pentru a se evita glicozilări multiple care ar crea dificultăţi în organizarea spaţială a proteinelor.

3. Prelucrarea glicoproteinelor purtătoare ale unui oligozaharid precursor constă în remodelarea acestuia cu formarea oligozaharidelor complexe. Acest proces decurge în complexul Golgi unde glicoproteinele „imature" sunt aduse de către microveziculele ce se detaşează din capetele reticulului endoplasmic. Prelucrarea oligozaharidului presupune înlăturarea unor resturi glicozil şi adăugarea altora, operaţie efectuată de glicozidaze (esenţial manozidaze) şi glicozil transferaze (galactozil-transferaze, fucozil-transferaze, sialil-transferaze).

Glicozil transferazele alcătuiesc un sistem multienzimatic cu determinare spaţială rigidă. Adăugarea într-o succesiune foarte strictă a unităţilor glicozil este rezultatul specificităţii de substrat a glicozil transferazelor; produsul de glicozilare al fiecărei etape constituie substratul exclusiv al următoarei enzime din sistem. Principiul sintezei oligozaharidelor „mature" corespunde deci aserţiunii o legătură - o glicozil transferază.

În Fig. VII.39 este reprezentată prelucrarea unui oligozaharid precursor cu formarea unei glicoproteine „mature". Variabilitatea fragmentului oligozaharidic în diferite

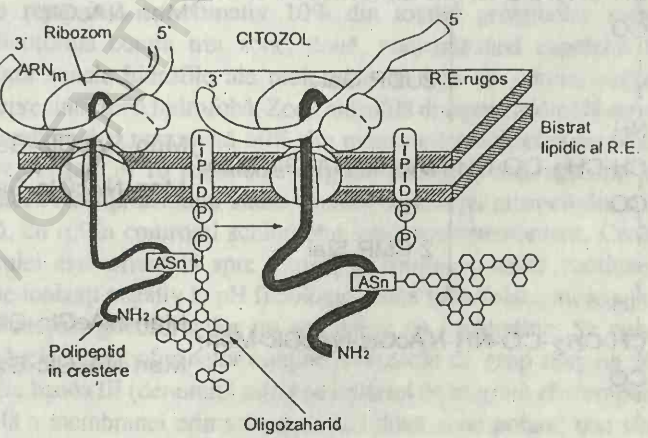


Fig. VII. 38 - Glicozilarea unei proteine născânde în lumenul reticulului endoplasmic

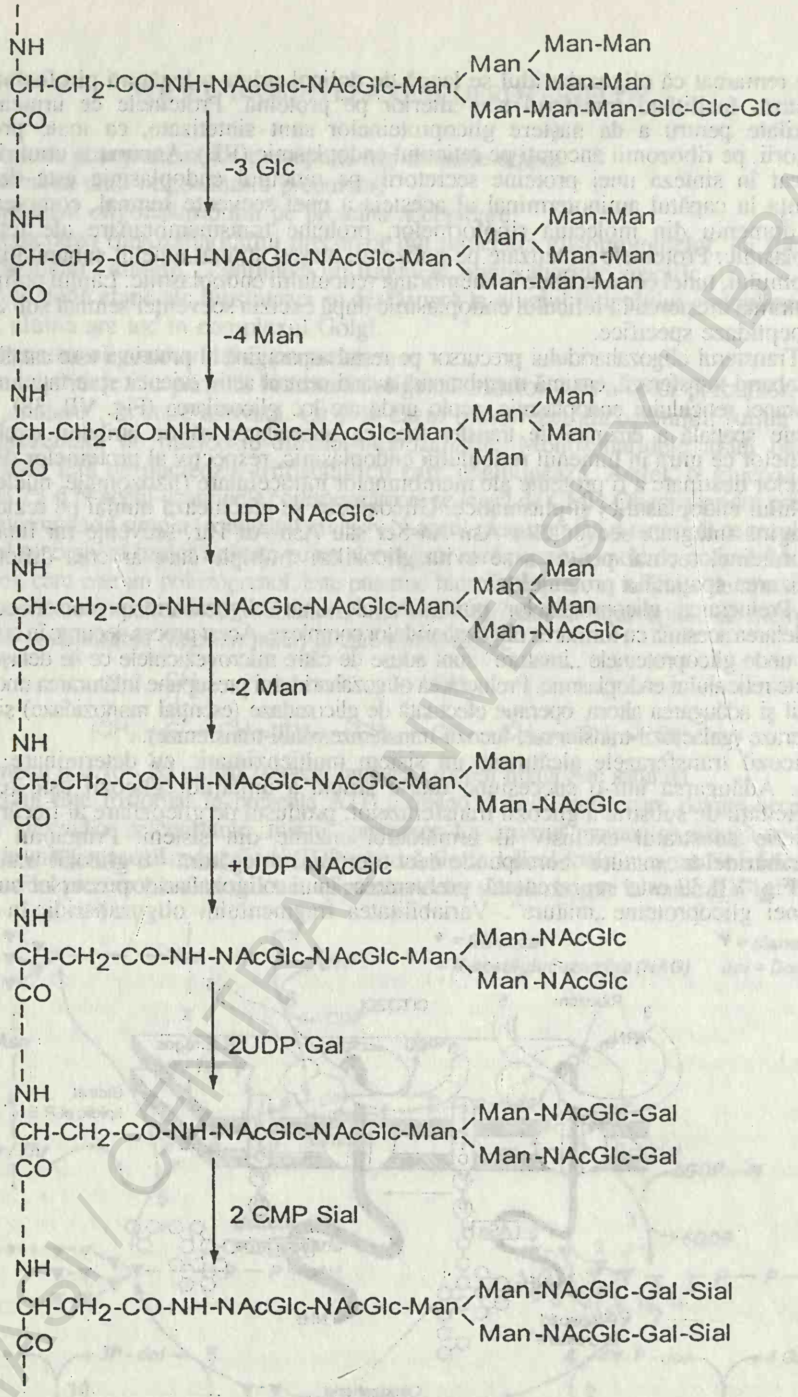


Fig. VII. 39 - Prelucrarea oligozaharidului precursor
şi obţinerea glicoproteinei mature

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

glicoproteine „mature" sugerează că celula adoptă un program diferit de prelucrare a oligozaharidului precursor, în general acelaşi, funcţie de lanţul polipeptidic de care este legat. Glicoproteinele „maturate" în complexul Golgi sunt transportate pe faţa concavă a acestuia spre membranele plasmatice, lizozomale, nucleare, de către veziculele secretorii golgiene (coated vesicles). Orientarea glicoproteinelor spre membranele intracelulare sau spre cea plasmatică este, probabil, decisă de o unitate monozaharidică variabilă.

Fuzionarea veziculelor golgiene cu membrana plasmatică are ca rezultat ancorarea glicoproteinelor pe faţa externă a acesteia. Clatrina din veziculele secretorii, proteină origanizată structural ca un poliedru, are abilitatea de a integra şi transporta componente ale membranei plasmatice spre interiorul celulei, unde vor fi reutilizate la nivelul complexului Golgi, asigurându-se astfel fluxul de membrane între citosol şi membrana plasmatică.

VII. 9.2. SEMNIFICAŢIA BIOLOGICĂ A GLICOPROTEINELOR

Prezenţa ubicuitară a glicoproteinelor pledează pentru o funcţie vitală a acestora. În organismele animale, glicoproteinele joacă un rol proeminent în procesele de apărare, creştere celulară, medierea unei varietăţi de interacţiuni intercelulare, transport al unor compuşi endo- şi exogeni, edificarea unor structuri intra- sau extracelulare.

În general, activitatea biologică a glicoproteinelor este realizată de partea proteică, părţii glucidice revenindu-i aspectul informaţional care îi permite modularea funcţiei acestor entităţi ca şi decizia asupra destinaţiei şi duratei lor de existenţă.

Aşa cum s-a arătat, colagenul şi elastina sunt glicoproteine care îndeplinesc un rol structural important în constituirea matrixului celular. Anumiţi hormoni (hormonul foliculo-stimulant, hormonul luteinizant, tireotropina) sunt hormoni glicoproteici.

Numeroase proteine ce intră în structura membranelor sunt glicoproteine. Printre cele mai cunoscute se numără glicoforinele şi glicoproteina din banda III.

Glicoforinele reprezintă un grup de proteine integrale prezente în glicocalixul eritrocitar şi care reprezintă aproximativ 10% din totalul proteinelor membranare. Moleculele de glicoforină conţin trei zone; două, corespunzând capetelor N- şi C-terminale, reprezintă zonele hidrofile ale moleculei, iar cea de a treia, cuprinsă între zonele hidrofile, reprezintă zona hidrofobă. Zona hidrofilă dinspre capătul N-terminal este situată în afara membranei şi reprezintă 60% din masa moleculei, conţine peste 100 de resturi glucidice repartizate în 16 fragmente oligozaharidice având, aproape invariabil, acid sialic la capete. Prezenţa acidului sialic conferă suprafeţei eritrocitului o încărcare negativă puternică, cu rol în controlul schimbului ionic transmembranar. Cealaltă zonă hidrofilă a moleculei este orientată spre citosol şi conţine o mare cantitate de acid glutamic şi aspartic ionizaţi negativ la pH fiziologic. Zona hidrofobă a moleculei străbate bistratul lipidic. Funcţiile glicoforinelor nu se cunosc cu certitudine. Se consideră că partea bogată în glucide a glicoforinelor conţine antigenele de grup sanguin (A, B, O).

Glicoproteina din banda III (denumită astfel pe criteriul de migrare electroforetică) este o proteină integrală a membranei eritrocitare, având două zone polare: una situată spre capătul C-terminal expus în spaţiul extracelular şi conţinând un mic procent de glucide, cealaltă situată spre capătul N-terminal orientat spre citosol. Între cele două zone hidrofile

se află zona hidrofobă care traversează de câteva ori bistratul lipidic. Se pare că această distribuţie a zonei hidrofobe permite glicoproteinei din banda III să constituie un canal hidrofil pentru ionii de clorură şi bicarbonat, consacrând-o ca pe o proteină eritrocitară cu rol major în transportul oxigenului şi dioxidului de carbon.

Deosebit de importantă este participarea glicoproteinelor în procesele de apărare şi recunoaştere. Imunoglobulinele, factorii sistemului complement, interferonul, receptorii hormonali, unele proteine ale coagulării (trombina, fibrinogenul) sunt, de asemenea, glicoproteine.

Recunoaşterea celulă-celulă, bacterie-celulă, virus-celulă este mediată de glicoproteine. Una dintre aceste glicoproteine, care a suscitat un interes deosebit este fibronectina, considerată a juca un rol important în procesul de adeziune celulară şi având implicaţii în transformarea neoplazică a ţesuturilor.

Unele glicoproteine servesc transportului unor compuşi endo sau exogeni (feritina, ceruloplasmina, haptoglobina, factorul intrinsec, proteinele de transport al unor hormoni etc.).

Protejarea suprafeţelor intra- şi extracelulare împotriva unor factori mecanici sau chimici ca şi a unor agresiuni bacteriene sau virale se realizează cu participarea glicoproteinelor.

VII.10. PROTEOGLICANII

Proteoglicanii (PG) sunt biomolecule conţinând fragmente heteropolizaharidice neramificate, legate covalent la partea proteică a moleculei. Conţinutul glucidic al proteoglicanilor variază între 85-90% din masa moleculară.

Proteoglicanii se găsesc în substanţa fundamentală care umple spaţiul dintre celule, în cartilagii, tendoane, piele, lichid sinovial. Interacţiunile între proteoglicani şi moleculele de colagen, elastină, fibronectină sunt decisive în organizarea matricei extracelulare (vezi mai departe).

În proteoglicani, polizaharidele sunt constituite din unităţi dizaharidice repetabile care conţin invariabil o ozamină (glucozamina sau galactozamina); din acest motiv fragmentele glucidice ale proteoglicanilor sunt denumite şi glicozaminoglicani (GAG). Cealaltă componentă a unităţii dizaharidice este reprezentată (cu o excepţie) de acidul glucuronic sau epimerul său la C_5 - acidul iduronic. Toate unităţile dizaharidice (cu o excepţie) conţin grupări sulfat legate covalent la oxigen sau azot.

Diferenţele structurale între glicozaminoglicani sunt determinate de:

– natura monozaharidelor ce constituie unitatea dizaharidică;

– configuraţia anomerică şi poziţia legăturii glicozidice ce se stabileşte în şi între unităţile dizaharidice;

– numărul şi localizarea grupărilor sulfat.

Se cunosc şapte tipuri de glicozaminoglicani, a căror structură este reprezentată în Tabelul VII.1. „De remarcat că glicozaminoglicanii sunt polianioni, rezultat al numărului mare de anioni carboxilat şi sulfat prezenţi în molecule, caracteristică structurală esenţială care le determină implicarea funcţională.

Tabelul VII. 1.

Glicozaminoglicanii

Glicozamino-glicanul	*Greutatea moleculara*	*Dizaharidul repetitiv* $(A-B)_n$		*Grupări sulfat/unitate de dizaharid*	*Legat la proteina*	*Alte componente glucidice*	*Distribuția tisulară*
		Monozaharid	*Monozaharid*				
Acid hialuronic	4 000-8x10^6	Acid D-glucuronic	N-acetil D-glucozamina	0	–	0	corp vitros, cartilaj,lichid sinoval
Condroitin 4-sulfat	5 000-50 000	Acid D-glucuronic	N-acetil D-galactozamina	0,2-1,0	+	D-galactoza	cartilaj,oase artere,cornee piele
Condroitin 6-sulfat	5 000-50 000	Acid D-glucuronic	N-acetil D-galactozamina	0,2-2,0	+	,,	cornee,oase artere,piele
Dermatan sulfat	15 000-40 000	Acid D-glucuronic sau Acid L-iduronic	,,	1,0-2,0	+	,,	piele,sînge inima,valve
Heparan sulfat	5 000-12 000	,,	N-acetil D-glucozamina	0,2-3,0	+	,,	artere,plămîni suprafața celulelor
Heparina	6 000-25 000	,,	,,	2,0-3,0	+	,,	ficat,piele plămîni
Keratan sulfat	4 000-19 000	D-galactoza	,,	0,9-1,8	+	D-galactozamina,D-monoza, L-fucoza,acid sialic	cartilaj, cornee

Cu excepţia acidului hialuronic, care formează lanţuri heteropolizaharidice solitare, ceilalţi glicozaminoglicani se asociază covalent cu proteine, formând proteoglicani. În majoritatea cazurilor legătura între glicozaminoglicani şi proteine este o legătură oxigen-glicozidică stabilită între serină şi xiloza aparţinând unei unităţi trizaharidice de legătură (serină-xiloză-galactoză-galactoză- [Monozaharid I - Monozaharid II]$_n$ (Fig. VII.40). Uneori legătura cu proteina se stabileşte între N-acetil-galactozamină şi serină, treonină sau asparagină.

Caracterul hidrofil puternic şi densitatea mare de sarcină negativă, care le permite să lege cationi osmotic activi, fac ca proteoglicanii să lege mari cantităţi de apă. Acest fapt, ca şi rigiditatea lanţurilor polizaharidice, exclude posibilitatea formării unor structuri globulare compacte. Proteoglicanii ocupă, ca atare, volume disproporţionat de mari faţă de procentul de greutate pe care-l reprezintă din masa proteinelor mediului extracelular. Organizarea aceasta difuză şi hidratarea avansată a moleculelor, care formează geluri chiar la concentraţii mici, uşurează migrarea moleculelor acvosolubile, în mediul extracelular. Creşterea concentraţiei de acid hialuronic în timpul morfogenezei şi reparării tisulare subliniază importanţa acestor atribute.

Acidul hialuronic, singurul GAG nesulfatat, este un polimer liniar cu masă moleculară foarte mare (de ordinul milioanelor) constituit din acid glucuronic şi N-acetil-glucozamină, legate alternativ prin legături β-(1,3)-glucuronidice şi β-(1,4)-glucozaminidice (Fig. VII.41).

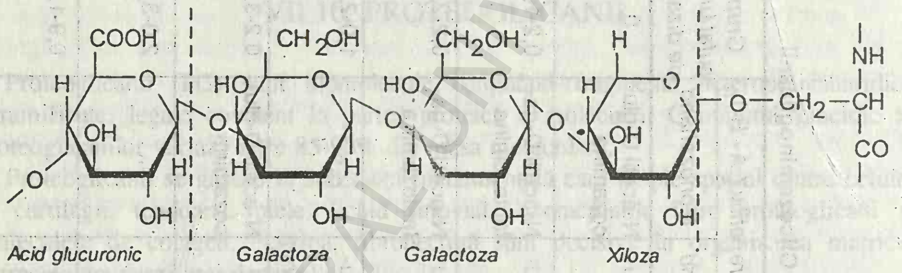


Fig. VII. 40 - Legătura dintre glicozaminoglican şi proteină

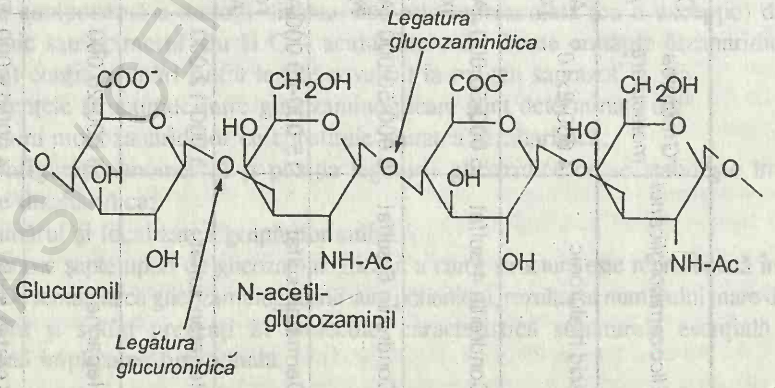


Fig. VII. 41 - Acidul hialuronic

Se pare că, spre deosebire de ceilalţi glicozaminoglicani, acidul hialuronic nu este legat covalent de o moleculă proteică. El poate forma însă arhitecturi moleculare „gigant" prin asamblare cu proteoglicani conţinând cu precădere condroitin sulfaţi. Calităţile structurale descrise, comportarea vâsco-elastică a soluţiilor sale, îl fac un bun lubrefiant şi „absorbant al şocurilor" iar prezenţa sa în cartilagii, umoarea vitroasă, lichidul sinovial, cordonul ombilical, este justificată.

Legăturile glicozidice ale acidului hialuronic pot fi hidrolizate de către hialuronidaza bacteriană, ceea ce duce la alterarea capacităţii de filtru selectiv a substanţei fundamentale şi la expunerea ţesuturilor la invazia bacteriană. Hialuronidaza este prezentă şi în ţesuturile animale ca şi în toxinele unor şerpi şi insecte.

Condroitin sulfaţii sunt glicozaminoglicanii majori din proteoglicanii cartilagiilor, arterelor, corneei, constituiţi din unităti de acid glucuronic şi N-acetil-galactozamină legate β-(1,3)-glucuronidic şi β-(1,4)-galactozaminidic (Fig. VII.42). Reziduurile de N-acetil galactozamină sunt sulfatate în poziţiile 4 sau 6 (condroitin -4, respectiv 6-sulfaţi). Ca donor de grupări sulfat active funcţionează 3-fosfo-adenozil-5-fosfosulfatul (Fig. VII.43).

Numărul mare de sarcini negative din molecula condroitin sulfaţilor îi consacră ca răşini schimbătoare de cationi, cu rol important în reglarea homeostaziei matricei cartilajului şi în mineralizarea matricei osoase.

Proteoglicanii conţinând condroitin sulfaţi se asociază, prin intermediul unor proteine de legare, cu acidul hialuronic, formând agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (circa 100 de molecule de proteoglicani/moleculă de acid hialuronic), cu masă moleculară de ordinul sutelor de milioane (Fig. VII.44).

Dermatan sulfatul este un constituent principal al ţesutului conjunctiv dermic; mai este prezent în tendoane, valvele cardiace, peretele vascular.

Din punct de vedere structural, diferă de condroitin sulfaţi prin acidul uronic, care în acest caz este reprezentat de acidul iduronic, epimerul la C_5 al acidului glucuronic (Fig. VII.45).

Heparina este un glicozaminoglican având o serie de particularităţi structurale din care decurg şi unele particularităţi funcţionale. Unităţile dizaharidice manifestă o mare heterogenitate în privinţa componentei acid uronic, care poate fi acid glucuronic sau acid iduronic sulfatat, cât şi a glicozaminei care poate fi N-sulfatată sau N-acetilată. Principala particularitate structurală a heparinei o constituie cantitatea importantă de grupări sulfat legate la azotul aminic (grupări N-sulfat). Sulfatarea glucozaminei este numai parţială, 50 la sută din resturile de glucozamină fiind, totuşi, acetilate. Grupările O-sulfat sunt localizate în general la C_6 al glucozaminei şi C_2 al acidului iduronic. O structură posibilă a heparinei, cu o distribuţie arbitrar aleasă a resturilor sulfat şi a tipului de acid uronic, este redată în Fig. VII.46.

Spre deosebire de ceilalţi GAG, heparina nu este un component intracelular, ea este sintetizată în mastocitele care bordează peretele arterial în ficat, piele şi plămân.

Acţiunea anticoagulantă a heparinei s-ar explica prin abilitatea acesteia de a accentua acţiunea de inhibare a trombinei, manifestată de antitrombina III. Legarea heparinei la antitrombina III induce în molecula acesteia o tranziţie alosterică ce favorizează legarea sa la trombină.

Heparina joacă un rol important şi în procesul de clarifiere a plasmei prin acţiunea de eliberare în circulaţie a lipoprotein lipazei din pereţii capilarelor (enzima are drept substrat chilomicronii şi lipoproteinele de densitate foarte joasă) (vezi lipidele).

Degradarea proteoglicanilor, ca şi cea a glicoproteinelor, constă în acţiunea secvenţială a unor enzime hidrolitice: glucozidaze, proteaze, sulfataze, deacetilaze.

Acumularea în ţesuturi şi excreţia în urină a unor produşi de degradare incompletă a proteoglicanilor caracterizează un grup de maladii genetice, reunite sub numele de mucopolizaharidoze, datorate unor deficite ale enzimelor hidrolitice (lizozomale).

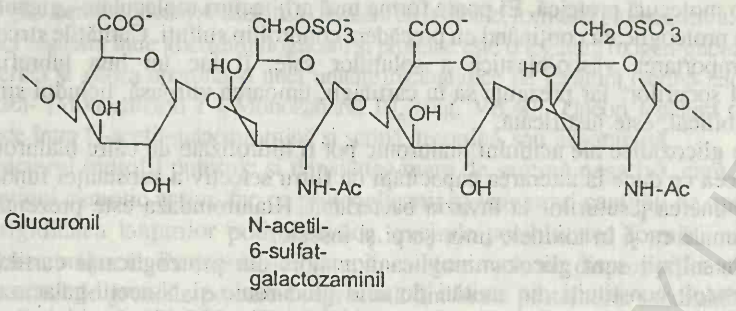


Fig. VII. 42 - Condroitin 6-sulfatul

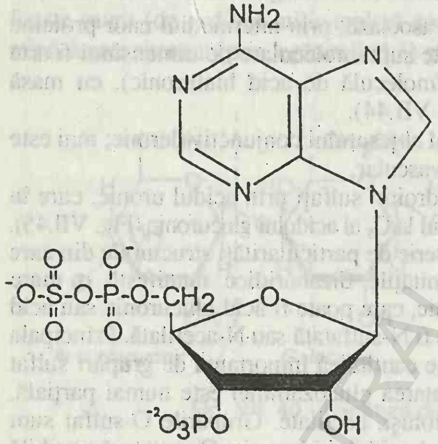


Fig. VII. 43 - 3'-fosfo-adenozil-5'-fosfosulfatul

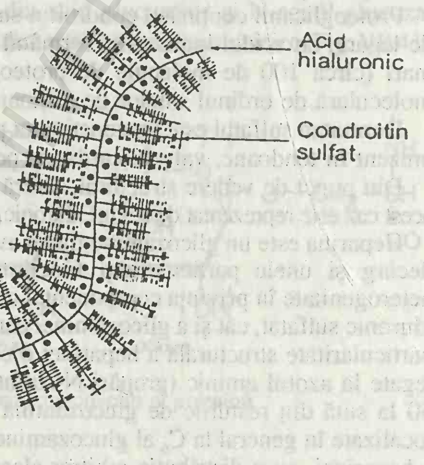


Fig. VII. 44 - Structura unui proteoglican

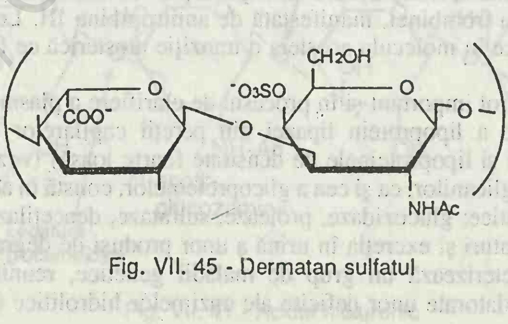


Fig. VII. 45 - Dermatan sulfatul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

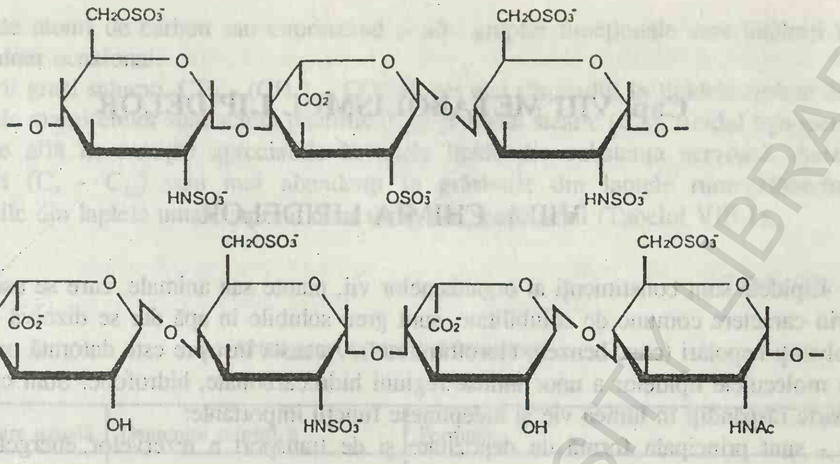


Fig. VII. 46 - Heparina

Tabelul VII.2 ilustrează modificările biochimice corelate cu deficitul enzimatic şi manifestarea clinică a câtorva tipuri de mucopolizaharidoze.

Posibilitatea depistării prenatale a acestor maladii, prin analiza lichidului amniotic, va deschide, probabil, perspective terapeutice sau de ameliorare a consecinţelor acestora.

Tabel VII. 2.

Tipuri de mucopolizaharidoze

SINDROMUL	TIPUL	TRĂSĂTURI CLINICE	PRODUSI ACUMULATI	DEFICIT ENZIMATIC
Hurler	I	-întirziere mintală -deformări schelet -opacitate a corneei -modificari somatice	-Dermatan sulfat si heparan sulfat in urină si tesuturi -Dermatan sulfat in fibroblaşti	α - L - iduronidaza
Hunter	II	-ca in I + surditate	-ca mai sus	α - L - iduronidaza + iduronat sulfataza
Sanfilippo	A III B D IV	-întirziere mintală -modificări ale scheletului	-Heparan sulfat in urină si tesuturi	-Heparan sulfamidaza -N-α-D-glucozaminidaza -N-acetil-glucozamin-6-sulfataza
Maroteaux-Lamy	VI	-deformări ale scheletului -opacitate a corneei	-Dermatan sulfat in urină	N-acetil-D-galactozamin sulfataze

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. VIII METABOLISMUL LIPIDELOR

VIII.1. CHIMIA LIPIDELOR

Lipidele sunt constituenţi ai organismelor vii, plante sau animale, care se aseamănă prin caractere comune de solubilitate, sunt greu solubile în apă dar se dizolvă uşor în solvenţi nepolari (eter, benzen, cloroform etc.). Această însuşire este datorată prezenţei în moleculele lipidelor a unor întinse regiuni hidrocarbonate, hidrofobe. Sunt compuşi foarte răspândiţi în lumea vie şi îndeplinesc funcţii importante:

- sunt principala formă de depozitare şi de transport a rezervelor energetice ale organismelor;
- au rolul de izolatori electrici, termici şi mecanici;
- sunt constituenţi structurali ai membranelor celulare şi intracelulare;
- unele lipide au roluri importante în procesele de comunicare şi recunoaştere intercelulară;
- sunt vitamine, hormoni etc.

Natura chimică a lipidelor este foarte variată. Unele cuprind acizi graşi, legaţi esteric sau amidic şi prin hidroliză sunt descompuse în substanţele componente. Acestea sunt *lipidele saponifiabile*. O a doua clasă, lipidele *nesaponifiabile*, reuneşte diverse categorii de compuşi, hidrocarburi superioare şi derivaţi oxigenaţi ai acestora, care nu sunt scindate hidrolitic în compuşi simpli. Caracterul lipidic sau gras al unor compuşi atât de diverşi din punct de vedere chimic le este conferit de prezenţa în moleculele lor a unor întinse regiuni hidrofobe. În cazul lipidelor saponifiabile, proprietăţile hidrofobe aparţin de regulă resturilor de acizi graşi. Unele lipide sunt asociate cu proteine şi alcătuiesc lipoproteinele, altele cu glucide şi dau naştere la glicolipide.

Principalele grupe de lipide saponifiabile sunt:

- acilglicerolii sau gliceridele;
- fosfogliceridele sau fosfatidele;
- sfingolipidele;
- cerurile (ceride).

Lipidele nesaponifiabile sunt în genere hidrocarburi, alcooli, aldehide, acizi care cuprind schelete alifatice sau ciclice cu structură poliizoprenică: terpene, carotenoizi, steroizi.

VIII.1.1. ACIZII GRAŞI

Acizii graşi sunt componenţi ai majorităţii lipidelor saponifiabile. În lipidele izolate de la diverse specii de plante şi animale au fost identificaţi peste 100 acizi diferiţi. Totuşi acizii graşi tipici cei mai răspândiţi şi cei mai abundenţi sunt acizii monocarboxilici alifatici cu catenă normală saturată sau nesaturată şi cuprind un număr pereche de atomi de carbon (de la 4 la 26). Acizi graşi ciclici, cu catenă ramificată, cu număr

BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

impar de atomi de carbon sau cuprinzând şi alte grupări funcţionale sunt întâlniţi în natură doar ocazional.

Acizii graşi saturaţi, CH_3 - $(CH_2)_n$ - COOH, cei mai răspândiţi în lipidele izolate din ţesuturile mamiferelor sunt acidul palmitic (C_{16}) şi acidul stearic (C_{18}). Acidul lignoceric (C_{24}) se află în cantităţi apreciabile în unele lipide din substanţa nervoasă. Acizii inferiori (C_4 - C_{10}) sunt mai abundenţi în grăsimile din laptele rumegătoarelor. Grăsimile din laptele uman cuprind doar urme din aceşti acizi (Tabelul VIII.1).

Tabelul VIII.1.

Acizii graşi saturaţi şi nesaturaţi

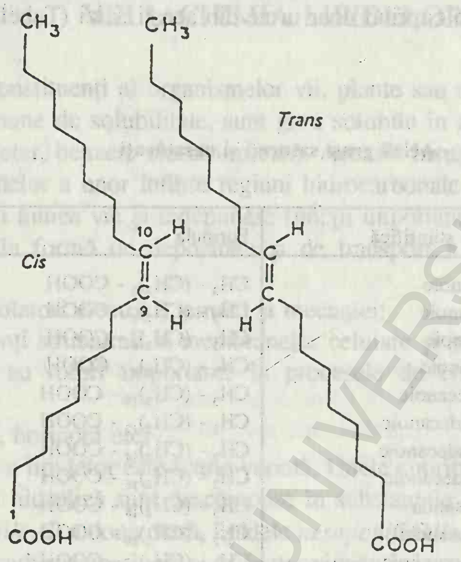
Denumire uzuală	Denumire ştiinţifică	Formula
Acid butiric	Acid butanoic	CH_3 - $(CH_2)_2$ - COOH
Acid caproic	Acid hexanoic	CH_3 - $(CH_2)_4$ - COOH
Acid caprilic	Acid octanoic	CH_3 - $(CH_2)_6$ - COOH
Acid capric	Acid decanoic	CH_3 - $(CH_2)_8$ - COOH
Acid lauric	Acid dodecanoic	CH_3 - $(CH_2)_{10}$ - COOH
Acid miristic	Acid tetradecanoic	CH_3 - $(CH_2)_{12}$ - COOH
Acid palmitic	Acid hexadecanoic	CH_3 - $(CH_2)_{14}$ - COOH
Acid stearic	Acid octadecanoic	CH_3 - $(CH_2)_{16}$ - COOH
Acid arahic	Acid eicosanoic	CH_3 - $(CH_2)_{18}$ - COOH
Acid behenic	Acid docosanoic	CH_3 - $(CH_2)_{20}$ - COOH
Acid lignoceric	Acid tetracosanoic	CH_3 - $(CH_2)_{22}$ - COOH
Acid palmitoleic	Acid Δ^9 - hexadecenoic	CH_3 - $(CH_2)_5$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
Acid oleic	Acid Δ^9 - octadecenoic	CH_3 - $(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
Acid linoleic	Acid $\Delta^{9,12}$ - octadecadienoic	CH_3 - $(CH_2)_4$-$(CH=CH-CH_2)_2$-$(CH_2)_6$-COOH
Acid linolenic	Acid $\Delta^{9,12,15}$-octadecatrienoic	CH_3-CH_2-$(CH=CH-CH_2)_3$-$(CH_2)_6$-COOH
Acid arahidonic	Acid $\Delta^{5,8,11,14}$-eicosatetraenoic	CH_3-$(CH_2)_4$-$(CH=CH-CH_2)_4$-$(CH_2)_2$-COOH
Acid nervonic	Acid Δ^{15}-tetracosenoic	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_{13}$-COOH
Acid cerebronic	Acid α-hidroxilignoceric	CH_3-$(CH_2)_{21}$-CHOH-COOH
Acid hidroxinervonic	Acid α-hidroxitetracosenoic	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_{12}$-CHOH-COOH

Acizii graşi netasuraţi cuprind una sau mai multe legături duble etilenice. Aceşti acizi sunt caracterizaţi prin lungimea catenei hidrocarbonate şi prin poziţia dublei (sau a dublelor) legături: C_n: Δ^m. Cei mai importanţi acizi graşi nesaturaţi sunt acidul palmitoleic (C_{16}: Δ^9), acidul oleic (C_{18}: Δ^9), acidul linoleic (C_{18}: $\Delta^{9,12}$), acidul linolenic (C_{18}: $\Delta^{9,12,15}$), acidul γ -linolenic (C_{18}: $\Delta^{6,9,12}$), acidul arahidonic (C_{20}: $\Delta^{5,8,11,14}$).

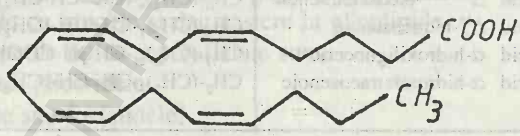
Proprietăţile acizilor graşi. Acizii graşi saturaţi până la C_8 sunt lichizi, ceilalţi sunt solizi. Acizii nesaturaţi sunt lichizi. În cristale, catenele hidrocarbonate saturate au o configuraţie în zig-zag (cu unghiuri de valenţă de 109°28') şi sunt aşezate paralel.

Acizii graşi etilenici prezintă izomerie cis-trans. Formele naturale ale acestor acizi sunt izomerii cis. Configuraţia cis a unei duble legături determină o îndoire cu 30° a catenei hidrocarbonate. Prin aceasta este perturbată aşezarea ordonată paralelă a catenelor lungi ale acizilor graşi. Nesaturarea acizilor graşi este un element de reglare a

fluidităţii lipidelor care îi cuprind şi, respectiv, a membranelor biologice. Acidul oleic are o legătură dublă cu configuraţie cis. Izomerul său trans este acidul elaidic. Configuraţiile lor sunt:



În cazul acidului arahidonic, cele patru legături cis conferă catenei forma literei U:



Acizii graşi sunt puţin solubili în apă, solubilitatea scăzând odată cu lungimea catenei hidrocarbonate.

Din punct de vedere chimic acizii graşi prezintă reacţiile grupării carboxil:

- formează săruri, săpunuri, cu proprietăţi tensioactive;
- formează esteri; în numeroase clase de lipide acizii graşi se află legaţi esteric (gliceride, fosfogliceride);
- formează amide (în sfingolipide acizii graşi sunt legaţi amidic la sfingozină);

Catenele hidrocarbonate cu legături duble:

- adiţionează hidrogen, halogeni;
- suferă procesul de peroxidare.

VIII.1.2. ACILGLICEROLII (GLICERIDELE SAU GRĂSIMILE NEUTRE)

Sunt lipidele cele mai abundente din natură. Sunt componentele principale ale grăsimilor de rezervă din ţesuturi şi ale grăsimilor din lapte. În proporţii variabile se găsesc şi în lipoproteinele plasmatice.

Sunt esteri ai glicerolului (propantriol) cu acizi graşi, acilgliceroli. După numărul grupărilor alcoolice din glicerol esterificate se împart în monoacilgliceroli (monogliceride), diacilgliceroli (digliceride) şi triacilgliceroli (trigliceride):

CH_2OCOR	CH_2OH
|	|
$CHOH$	$CHOCOR_2$
|	|
CH_2OH	CH_2OH
α - sau	β - sau
1-acilglicerol	2-acilglicerol
(monoglicerid)	(monoglicerid)

CH_2OCOR	CH_2OCOR_1	CH_2OCOR_1
|	|	|
$CHOCOR_2$	$CHOH$	$CHOCOR_2$
|	|	|
CH_2OH	CH_2OCOR_2	CH_2OCOR_3
α,β - sau	α,α' - sau	triacilglicerol
1,2 -diacilglicerol	1,3-diacilglicerol	(triglicerid)
(diglicerid)	(diglicerid)	

Grăsimile de rezervă sunt alcătuite aproape exclusiv din trigliceride. Mono- şi digliceridele sunt intermediari în cursul sintezei şi degradării trigliceridelor şi se găsesc în ţesuturi în cantităţi mici.

Trigliceridele naturale există într-o varietate foarte mare diferenţiindu-se atât prin natura acizilor graşi constituenţi cât şi prin aranjarea lor în interiorul moleculei. Cele mai răspândite sunt trigliceridele mixte, acizii graşi ce intră în compoziţia unei grăsimi se răspândesc cât mai uniform în toate moleculele de trigliceride.

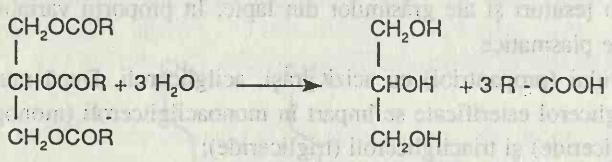
Trigliceridele din ţesutul adipos uman cuprind următorii acizi graşi (în procente din greutate): acid oleic (45%), acid palmitic (2%), acid linoleic (8%), acid palmitoleic (7%), acid stearic (7%), alţi acizi (8%).

Proprietăţile triacilglicerolilor. Starea de agregare a triacilglicerolilor depinde de compoziţia în acizi graşi: cele bogate în acizi saturaţi inferiori sau acizi nesaturaţi sunt lichide; cele cu un conţinut ridicat în acizi saturaţi superiori sunt solide. Tributirina şi trioleina sunt lichide, tristearina este solidă. Grăsimile naturale sunt amestecuri de diverşi triacilgliceroli, ele nu au un punct de fierbere sau de topire net. Cele solide prin încălzire se înmoaie treptat.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Triacilglicerolii au densităţi mai mici decât apa (0,96 g/cm³). Având caracter hidrofob foarte pronunţat nu se dizolvă în apă. Monoacilglicerolii şi diacilglicerolii au un slab caracter amfipatic.

Triacilglicerolii sunt hidrolizaţi în glicerol şi acizi graşi:

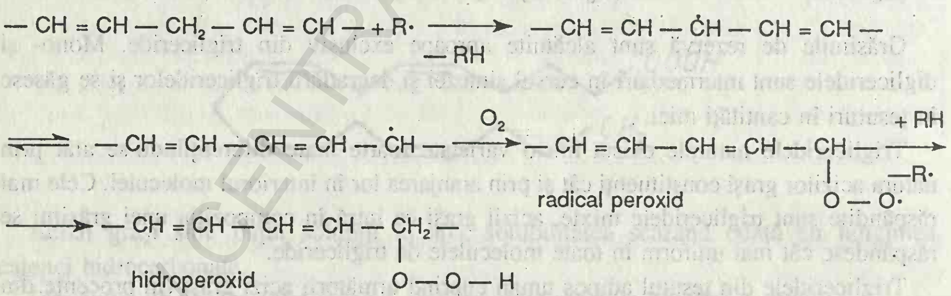


În laborator această reacţie necesită condiţii energice, temperaturi ridicate şi/sau catalizatori. În organism hidroliza triacilglicerolilor este catalizată de enzime denumite lipaze.

Catenele hidrocarbonate nesaturate ale resturilor acil prezintă proprietăţile specifice nesaturării. Grăsimile nesaturate adiţionează hidrogen. De exemplu, trioleina prin hidrogenare totală se transformă în tristearină. Hidrogenarea este asociată cu creşterea punctului de topire a grăsimii. Uleiurile vegetale solidificate prin hidrogenare sunt utilizate la prepararea margarinei.

Grăsimile nesaturate adiţionează halogeni, brom sau iod. Cantitatea de halogen fixată de o grăsime (g iod/100 g grăsime) este o măsură a gradului de nesaturare a grăsimii (indice sau cifră de iod).

Grăsimile nesaturate, îndeosebi acelea care cuprind acizi polietilenici, prin expunere la lumină, la aer şi în prezenţa unor factori care generează radicali liberi, suferă un proces de peroxidare (autooxidare) care le alterează gustul şi mirosul (râncezire). Acest proces este iniţiat de un radical liber ce se formează în sistem şi se propagă în lanţ. Poziţia cea mai vulnerabilă la un atac radicalic este poziţia învecinată unei duble legături, poziţia alilică:



Radicalul peroxidic poate reacţiona cu o nouă moleculă de grăsime generând un nou radical liber şi un hidroperoxid, R-OOH, procesul desfăşurându-se în lanţ. Hidroperoxidul la rândul lui generează alţi radicali liberi şi diverşi produşi de oxidare, de polimerizare, de sciziune a lanţurilor hidrocarbonate. În organism peroxidarea grăsimilor şi a altor lipide nesaturate este întârziată prin acţiunea unor factori antioxidanţi, captatori de radicali liberi. Totodată, organismul dispune de multiple mecanisme de apărare împotriva efectelor nocive ale peroxizilor.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

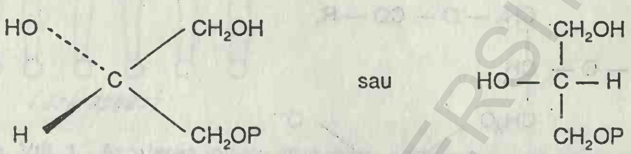
VIII.1.3. FOSFOGLICERIDELE (GLICEROFOSFOLIPIDELE, FOSFATIDELE)

Această categorie de lipide cuprinde cele mai importante lipide structurale. În asociere cu proteine şi alte lipide alcătuiesc membranele tuturor celulelor animale şi vegetale.

Substanţa de bază a acestor lipide este glicerol-fosfatul (sn-3-glicerol-fosfat, sn de la stereochemical numbering):

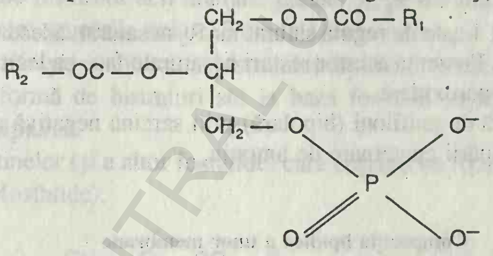
1 CH_2OH
2 $CHOH$
3 $CH_2OPO_3H_2$

Configuraţia acestui compus este:

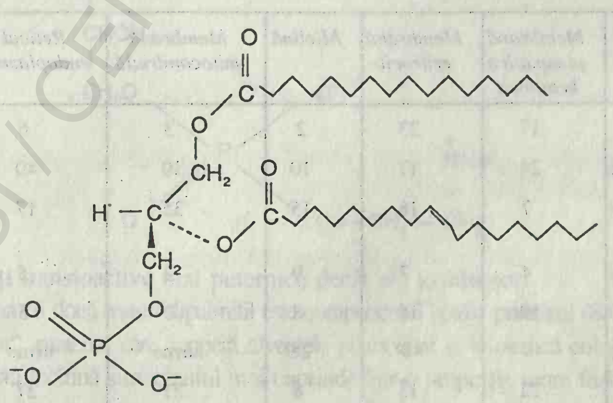


Acizii fosfatidici

Acizii fosfatidici cuprind două resturi acil (de regulă diferiţi) legate de glicerol fosfat:



Reprezentarea configuraţională a unui acid fosfatidic (palmitil-oleil-glicerol-fosfat) este:



B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

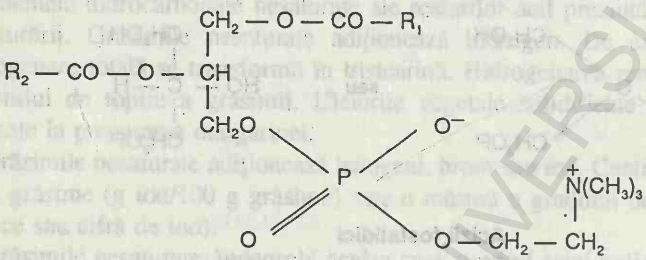
Acizii fosfatidici se găsesc în cantităţi mici, sunt intermediari în metabolismul fosfatidelor. De la acizii fosfatidici, prin legarea grupei fosforil la diverşi alcooli rezultă fosfatidele: fosfatidilcoline, fosfatidiletanolamine, fosfatidilserine, fosfatidilinozitoli, fosfatidilgliceroli.

Fosfatidilcolinele (lecitine)

Sunt cele mai abundente fosfolipide, se găsesc în proporţia cea mai mare în structurile lipoproteice membranare (Tabelul VIII.2). Cuprind restul fosfatidil legat la colină:

$HOCH_2 — CH_2 — N^+(CH_3)_3$.

Formula generală a unei lecitine este:



Restul acil din poziţia 1 este de regulă saturat iar R_2 nesaturat, adesea provine din acid linoleic, acid arahidonic. Prezenţa acestor resturi nesaturate face ca lecitinele să fie foarte sensibile la procesul de peroxidare.

Lecitinele au structură de amfiioni (bipolară) prin sarcina negativă a restului fosforil şi sarcina pozitivă a grupării cuaternare de amoniu.

Tabelul VIII.2.

Compoziţia lipidică a unor membrane

Lipide	*Membrană plasmatică hepatocit*	*Membrană eritrocit*	*Mielină*	*Membrană mitocondrială*	*Reticul endoplasmic*	*Membrană E. coli*
Colesterol	17	23	2	3	6	0
Fosfatidil-coline	24	17	10	39	40	0
Fosfatidil-etano-lamine	7	18	15	35	17	70
Fosfatidil-serine	4	7	9	2	5	urme
Sfingomieline	19	18	8	0	5	0
Glicolipide	7	3	28	urme	urme	0
Altele	22	13	8	21	27	30

Prezenţa resturilor acil hidrofobe şi a sarcinilor electrice pozitivă şi negativă conferă lecitinelor caracter amfipatic şi proprietăţi tensioactive puternice. În apă fosfatidilcolinele se dizolvă formând agregate, micelii, alcătuite din două straturi lipidice (Fig. VIII.1.)

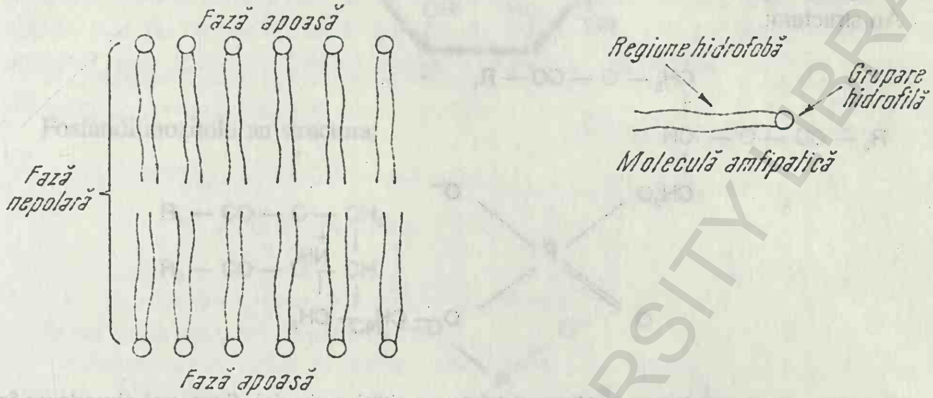
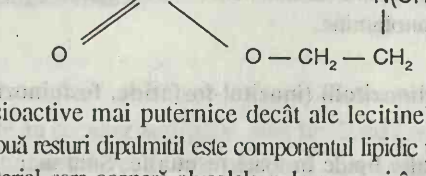


Fig. VIII. 1 - Asocierea într-un strat dublu a moleculelor lipidice amfipatice

Acest strat dublu lipidic este stabilizat prin forţele van der Waals dintre catenele hidrocarbonate ale resturilor acil aranjate paralel şi, pe de altă parte, prin interacţiunile electrostatice dintre grupările polare. Totodată, eliberarea apei sechestrată între resturile acil hidrofobe măreşte stabilitatea bistratului lipidic. Asocierea spontană a lipidelor amfipatice sub formă de bistraturi stă la baza formării membranelor biologice cu o structură dublu lipidică.

Derivaţii lecitinelor (şi a altor fosfatide) care cuprind un rest acil mai puţin se numesc lizolecitine (lizofosfatide):



şi au proprietăţi transioactive mai puternice decât ale lecitinelor.

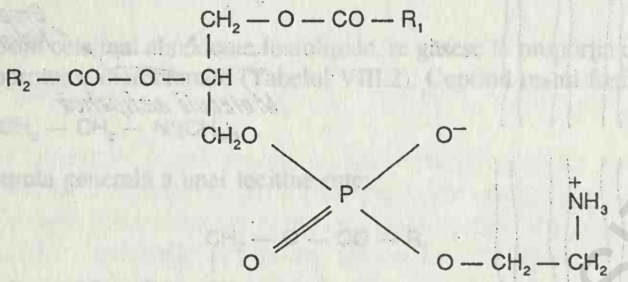
Fosfatidilcolina cu două resturi dipalmitil este componentul lipidic principal (80-90%) al „surfactantului pulmonar", material care acoperă alveolele pulmonare şi împiedică colapsul la expirare. Alături de această lecitină surfactantul mai cuprinde într-o proporţie mare fosfatidilglicerol.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fosfatidiletanolaminele (cefaline)

Sunt fosfatide ce cuprind restul fosfatidil legat de etanolamină (colamină): $HOCH_2CH_2NH_2$.

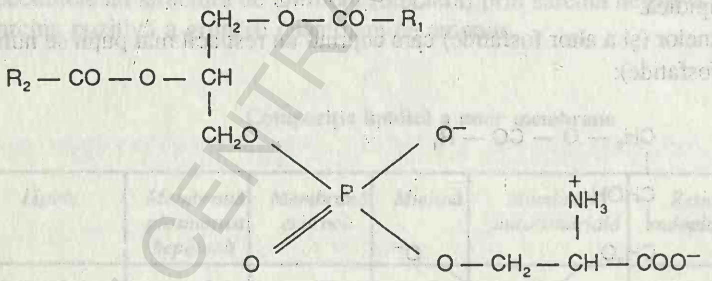
Au structura:



Se află în țesături alături de lecitine dar în cantități mai mici. Sunt mai abundente în lipidele din țesutul nervos (Tabelul VIII.2). Fosfatidiletanolaminele au structură amfionică, au caracter amfipatic, sunt sensibile la peroxidare. Prin metilarea grupării aminice se transformă în lecitine.

Fosfatidilserinele (serin-cefaline)

Însoțesc în cantități mici celelalte fosfolipide în membranele biologice. Cuprind restul fosfatidil legat de aminoacidul serină:

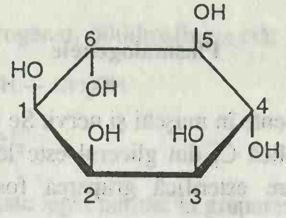


Sunt lipide amfipatice, posedă o sarcină netă (—). Prin decarboxilarea restului de serină dau naștere la fosfatidiletanolamine.

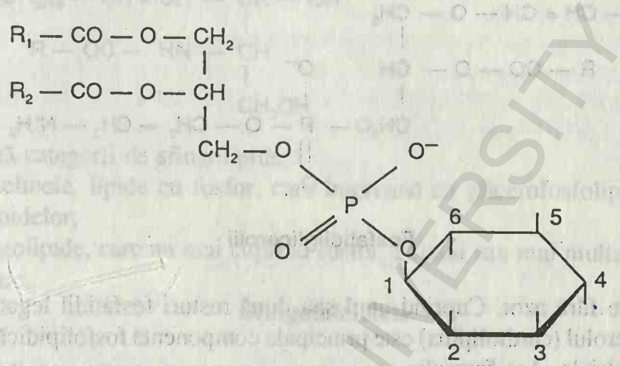
Fosfatidilinozitolii (inozitol-fosfatide, fosfoinozitide)

Se află alături de celelalte lipide în toate țesuturile. Sunt mai abundente în substanța nervoasă. Cuprind restul fosfatidil legat de un polialcool ciclic, inozitol (mezoinozitol). Mezoinozitolul este unul din cei 9-stereoizomeri ai hexahidroxi-ciclohexanului:

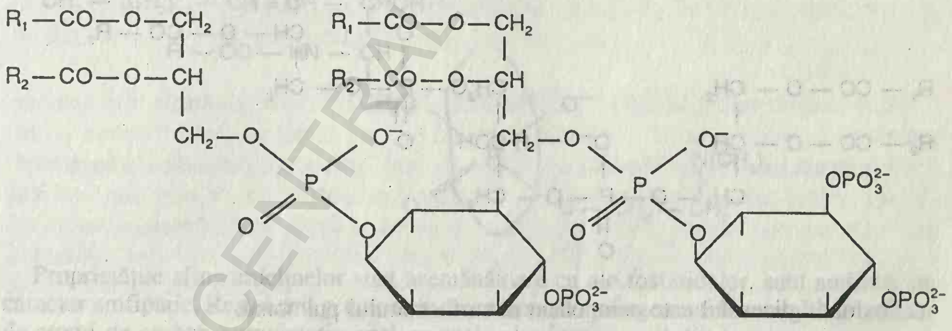
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Fosfatidilinozitolii au structura:



Pe lângă fosfatidilinozitoli mai există fosfatidilinozitoli-4-fosfat şi fosfatidilinozitoli-4,5-bisfosfat care mai cuprind unul sau două resturi fosfat legate la inozitol:



Fosfatidilinozitol-4-fosfat　　　　Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat

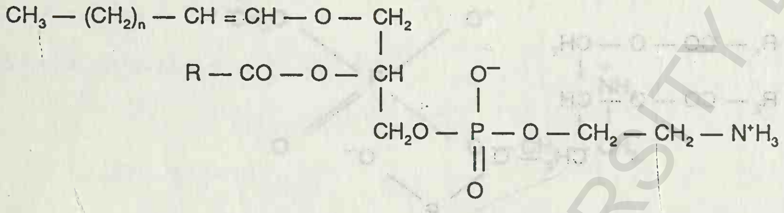
Inozitol-fosfatidele au caracter amfipatic, sunt lipide cu caracter puternic acid, la pH-ul fiziologic poartă sarcini negative, de la 1 până la 5. Au roluri importante în procesele de transmitere a semnalelor extracelulare în toate ţesuturile; sub acţiunea fosfolipazei C eliberează diacilglicerol şi inozitolfosfaţi, efectori ai unor mesageri extracelulari.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Plasmalogenele

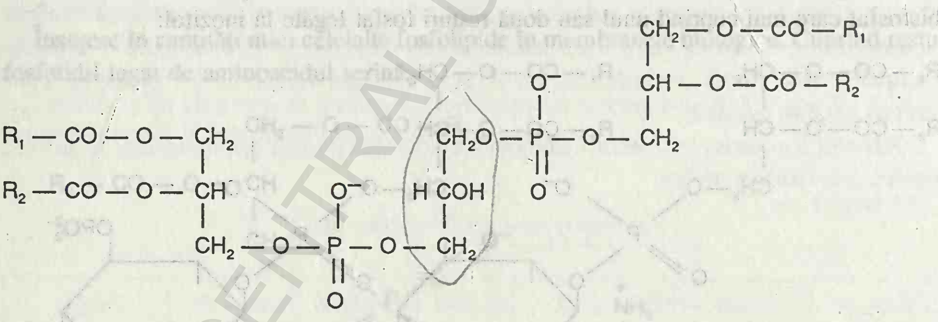
Sunt fosfolipide mai abundente în muşchi şi nervi. Se deosebesc de celelalte fosfatide prin aceea că gruparea alcoolică C_1 din glicerol este legată eteric de un enol alifatic superior; alcoolul azotat care esterifică gruparea fosforil este, cel mai frecvent, etanolamina.

Structura plasmalogenelor este:



Fosfatidilglicerolii

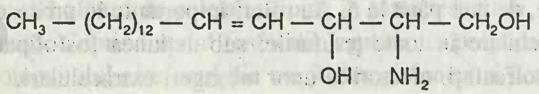
Sunt fosfatide fără azot. Cuprind unul sau două resturi fosfatidil legate de glicerol. Difosfatidilglicerolul (cardiolipina) este principala componentă fosfolipidică a membranei interne mitocondriale. Are formula:



Fosfotidilglicerolul este component al surfactantului pulmonar.

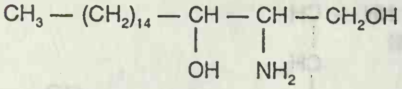
VIII.1.4. SFINGOLIPIDELE

Sunt lipide structurale ca şi fosfatidele, fiind absente în grăsimile de depozit. Ţesutul nervos cuprinde cantităţile cele mai mari de sfingolipide. Sunt derivaţi ai unui aminoalcool superior, sfingozina:

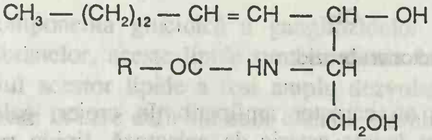


BCU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sau, mai rar, a derivatului hidrogenat, dihidrosfingozină:



În sfingolipide acidul gras este legat amidic la gruparea $-NH_2$ din sfingozină. Toate sfingolipidele cuprind această amidă, denumită ceramidă:

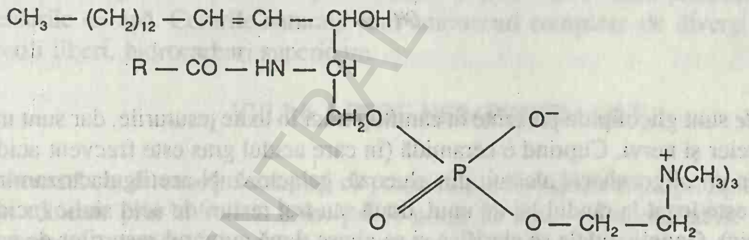


Există două categorii de sfingolipide:

- sfingomielinele, lipide cu fosfor, care împreună cu glicerofosfolipidele, alcătuiesc grupa fosfolipidelor;
- glicosfingolipide, care nu mai cuprind fosfor, ci unul sau mai multe resturi glicozil, sunt glicolipide.

Sfingomielinele

Sunt fosfolipide răspândite în toate structurile membranare, în lipoproteinele plasmatice. Sunt deosebit de abundente în substanţa nervoasă albă, în nervii periferici. Cuprind o ceramidă legată de fosforilcolină:



Proprietăţile sfingomielinelor sunt asemănătoare cu ale fosfatidelor, sunt amfioni, au caracter amfipatic. Restul acil şi catena hidrocarbonată a sfingozinei însumează un număr de atomi de carbon aproximativ egal cu acela al resturilor acil din lecitine.

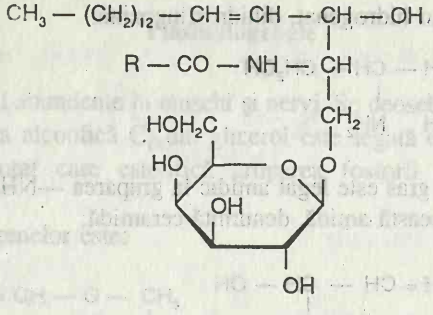
Glicosfingolipidele

Cuprind ceramidă legată glicozidic de monozaharide (hexoze) sau oligozaharide. Se împart în cerebrozide, glicolipide neutre, şi gangliozide, glicolipide acide.

Cerebrozidele se găsesc în majoritatea ţesuturilor dar sunt mai abundente în creier (substanţa albă), în nervi.

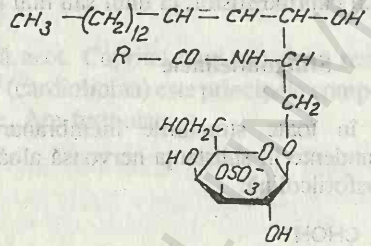
Cuprind o ceramidă (cu un acid gras cu 24 atomi de cabron) legată la β-galactoză (galactocerebrozid) sau, mai rar, la β-glucoză (glucocerebrozid):

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Galactocerebrozid

Cerebrozidele nu au sarcini electrice; au caracter amfipatic. In creier, galactocerebrozidele mai cuprind şi resturi sulfat legate esteric de galactoză, lipide polare denumite sulfatide:



Gangliozidele sunt glicolipide prezente în cantităţi mici în toate ţesuturile, dar sunt mai abundente în creier şi nervi. Cuprind o ceramidă (în care acidul gras este frecvent acidul stearic) legată la un oligozaharid alcătuit din glucoză, galactoză, N-acetilgalactozamină. Oligozaharidul este legat la rândul lui de unul, două sau trei resturi de acid sialic (acidul acetil-neuraminic). Gangliozidele se clasifică şi se citesc după numărul resturilor de acid sialic, în monosialo-gangliozide (GM), diasialo-gangliozide (GD) şi trisialo-gangliozide (GT). Natura oligozaharidului este desemnată printr-un indice numeric, 5-n, în care n arată numărul de unităţi hexozil. Seria 1 are patru unităţi hexozil.

De exemplu, gangliozidul GM_1 are structura (simplificată):

ceramidă - Glc - Gal - Gal NHAc - Gal
|
NANA

unde: Glc = glucoză
Gal = galactoză
Gal-NHAc = N-acetil-galactozamină
NANA = acid N-acetil-neuraminic

GM$_2$: ceramidă - Glc - Gal - Gal-NHAc
|
NANA

GD$_1$: ceramidă - Glc - Gal - Gal-NHAc - Glc
| |
NANA NANA

Componenta glucidică a gangliozidelor se găseşte totdeauna pe faţa externă a membranelor, aceste lipide sunt implicate în procesele de pe suprafaţa membranelor. Studiul acestor lipide a fost amplu dezvoltat prin descrierea unui număr de maladii ereditare în care deficitul unor enzime hidrolitice specifice pentru diversele legături din gangliozide determină întreruperea şirului de reacţii catabolice şi acumularea produsului situat în amonte faţă de enzima deficitară (gangliozidoze).

VIII.1.5. CERURILE

Sunt esteri ai acizilor graşi cu alcooli alifatici sau ciclici (steroli). De exemplu ceara de albine cuprinde în majoritate esterul acidului palmitic cu un alcool cu 32 atomi de carbon. Lanolina, grăsimea de pe lâna de oaie, este alcătuită în principal din esteri ai lanosterolului, ai colesterolului.

Cerurile sunt lipide saturate, cu un caracter foarte pronunţat hidrofob. Ele sunt secretate de epiderma plantelor şi animalelor şi formează un strat protector, împiedicând pierderile de apă. Cerurile naturale sunt amestecuri complexe de diverşi esteri, acizi şi alcooli liberi, hidrocarburi superioare.

VIII.1.6. LIPIDE NESAPONIFIABILE

Această clasă reuneşte compuşi cu proprietăţi de solubilitate propri lipidelor şi care nu sunt scindate prin hidroliză. Principalele grupe de lipide nesaponifiabile sunt terpenele, carotenoizii, steroizii. Toţi aceşti compuşi au o structură poliizoprenică (poliprenică), sunt formal derivaţi ai izoprenului. Unii dintre ei au formule poliizoprenice tipice:

$$H - (C_5H_8)_n - H \text{ sau } H - (CH_2 - \overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{C} = CH - CH_2 -)_n H$$

alţii prezintă un grad mai mic sau mai mare de nesaturare, cuprind funcţii oxigenate.

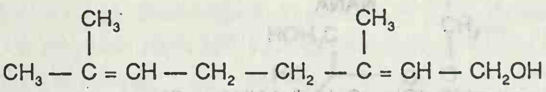
Terpenele

Terpenele sunt hidrocarburi, alcooli, aldehide, acizi cu structură poliizoprenică. Sunt foarte răspândite în regnul vegetal, intră în compoziţia uleiurilor eterice care dau mirosul florilor, al fructelor. Ţesuturile animale cuprind şi ele cantităţi mici de terpene. De

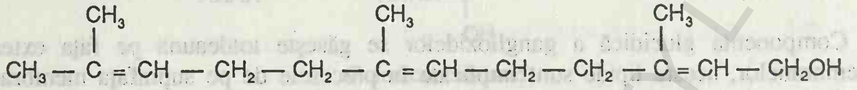
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

exemplu, geraniolul, farnesolul, scualenul, intermediari în biosinteza colesterolului, vitaminele K şi E, ubichinona, dolicolul.

Geraniolul este un alcool alcătuit din două unităţi izoprenice:

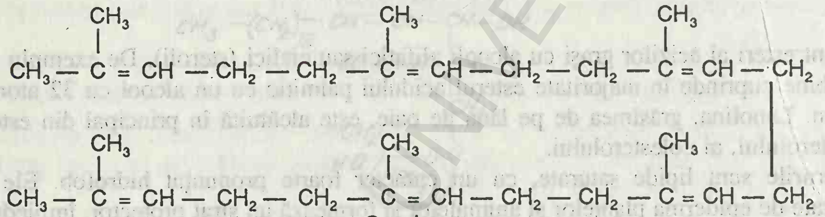


Farnesolul cuprinde trei unităţi izoprenice:



Geraniolul şi farnesolul, ca esteri pirofosforici, sunt intermediari în biosinteza colesterolului.

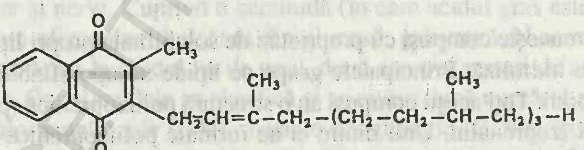
Scualenul este o hidrocarbură $C_{30}H_{50}$, alcătuită din 6 unităţi izoprenice, de fapt din două unităţi farnesil condensate cap-cap. Scualenul prin ciclizare dă naştere la un compus steroidic.



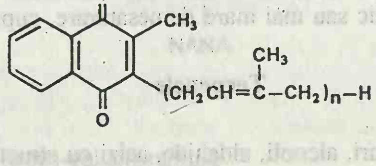
Scualen

Vitaminele K şi E cuprind catene hidrocarbonate poliprenice care le conferă liposolubilitatea.

Vitaminele K naturale (K_1 şi K_2) au formulele:



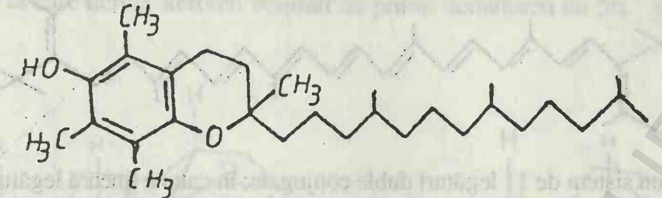
Vitamina K_1 (filochinonă)



Vitamina K_2 (menachinonă)
n = 6,7 sau 9

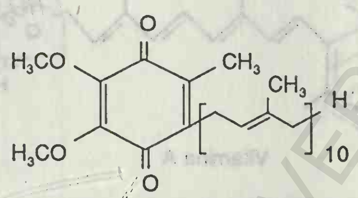
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vitamina E (α-tocoferolul) are formula:



Vitamina E

Ubichinona (coenzima Q), component redox al lanţului respirator mitocondrial, cuprinde o catenă poliizoprenică cu 50 atomi de carbon grefată pe nucleul benzochinonei:



Ubichinona (coenzima Q)

Dolicolii sunt alcooli superiori răspândiţi la plante şi animale, cuprind între 16 şi 20 unităţi izoprenice. Mamiferele cuprind un compus cu 100 atomi de carbon. Sub formă de ester fosforic, dolicol-fosfat, participă la sinteza glicoproteinelor în reticulul endoplasmatic şi în aparatul Gogi. Are formula:

$$H-(CH_2-\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}=CH-CH_2)_{19}-CH_2-\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{CH}}-(CH_2)_2-OPO_3^{2-}$$

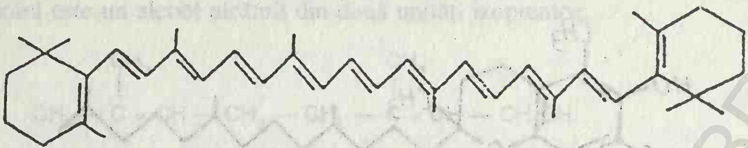
Unitatea oligozaharidică a unei glicoproteine se constituie sub formă de glicozil-fosforil-dolicol, după care are loc transferul în bloc al oligozaharidului pe proteina membranară acceptoare. Catena lungă hidrofobă a dolicolului rămâne înglobată în membrana lipidică iar lanţul oligozaharidic protuberează pe faţa externă a membranei de unde este transferat. În acest fel glicoproteinele cuprind totdeauna componenta glucidică pe suprafaţa externă a membranei.

Carotenoizii

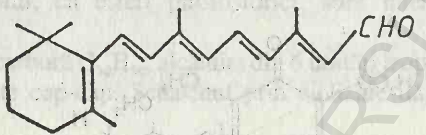
Această categorie de lipide cuprinde hidrocarburi puternic nesaturate cu schelet izoprenic şi derivaţii oxigenaţi ai acestora. Sunt răspândiţi în regnul vegetal unde joacă roluri importante în reacţiile fotochimice. Cuprind sisteme întinse cu legături duble conjugate şi sunt colorate în roşu-portocaliu. Carotenii α-, β-, γ-, sunt hidrocarburi $C_{40}H_{56}$,

BOGDAN ASACHI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

răspândiţi în morcovi, tomate şi alte plante. Formula β-carotenului este următoarea:



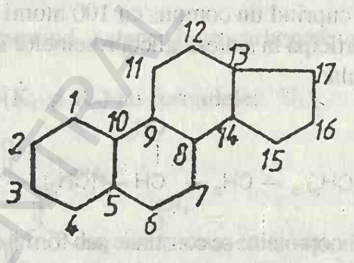
Cuprinde un sistem de 11 legături duble conjugate; în catena lineară legăturile duble au configuraţia trans. Carotenii sunt provitamine A. În ficat şi în peretele intestinal, din β-caroten prin scindare oxidativă (sub acţiunea unei dioxigenaze) se formează două molecule de vitamină A (retinal):



Vitamina A

Steroizii

În această clasă intră un număr mare de compuşi lipidici răspândiţi la plante, animale, microorganisme. Sunt derivaţi ai unei hidrocarburi ipotetice denumită steran (ciclopentanoperhidrofenantren) care cuprinde trei nuclee ciclohexanice şi unul ciclopentanic condensate:

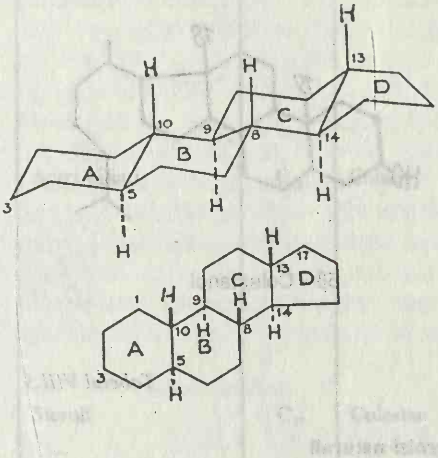


Diverşii steroizi diferă între ei prin grupări funcţionale şi catene laterale grefate pe nucleul steranic, prin prezenţa unor legături duble şi prin existenţa unui număr foarte mare de stereoizomeri.

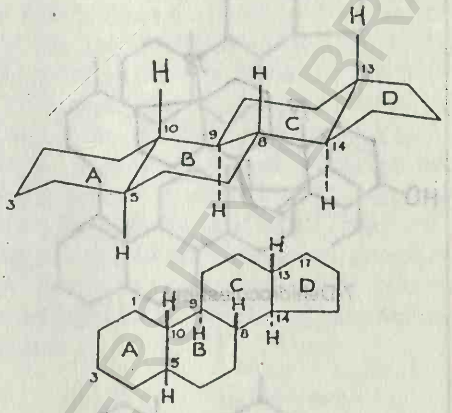
Condensarea a două (sau mai multor) nuclee ciclohexanice cu conformaţie scaun permite realizarea a două configuraţii la punctul de joncţiune a ciclurilor (cis sau trans). Steranul cu trei joncţiuni A/B, B/C, C/D poate exista sub forma a 64 stereoizomeri, după orientarea relativă a atomilor de hidrogen legaţi la C_5, C_8, C_9, C_{10}, C_{13}, C_{14}.

Scrierea formulelor acestor steroizomeri se face potrivit următoarelor convenţii: legăturile dirijate spre partea anterioară a ciclului sunt redate prin linii pline şi sunt denumite legături β. Substituenţii care se află pe partea opusă (posterioară) sunt legaţi prin legături α, redate prin linii întrerupte. În steroizii naturali substituenţii de la C_{10}, C_8, C_9,

C_{13} şi C_{14} au totdeauna aceeaşi orientare (α sau β). Atomul de hidrogen de la C_5 are însă în unii steroizi configuraţie α (seria 5α), în alţii β (seria 5β). Aceşti doi izomeri ai steranului de la care derivă steroizii naturali au primit denumirea de 5α - şi 5β-gonan:



5α-gonan

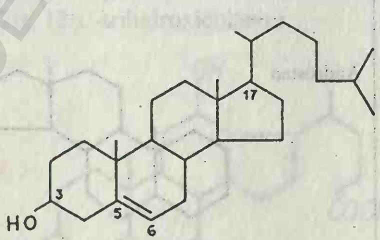


5β-gonan

Prin substituirea unui atom de hidrogen dintr-o grupare $-CH_2-$ a steranului apare posibilitatea existenţei a doi izomeri, α - şi, respectiv, β. Legarea unei grupări funcţionale α sau β antrenează diferenţe pronunţate în ceea ce priveşte reactivitatea şi acţiunile biologice.

Steroizii care au funcţii înrudite derivă de la o aceeaşi substanţă de bază. În Tabelul VIII.3 sunt prezentate principalele grupe de steroizi: hormonii estrogeni, androgeni, gestageni, corticosuprarenalieni, acizii biliari şi sterolii. Substanţele active, cardiotonice, din digitală (digitoxigenina, strofantidina, ouabagenina), au, de asemenea, structură steroidică. În acest capitol sunt descrişi sterolii şi acizii biliari.

Sterolii sunt alcooli steroidici prezenţi la toate organismele vii. Colesterolul este cel mai important sterol din regnul animal. El lipseşte la plante, microorganisme, nevertebrate. Este un component esenţial al tuturor structurilor membranare lipoproteice. Este un steroid C_{27} cu formula:



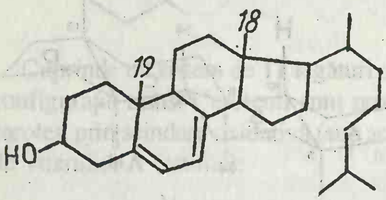
În organism se găseşte fie ca alcool liber, fie esterificat cu acizi graşi (acilcolesterol).

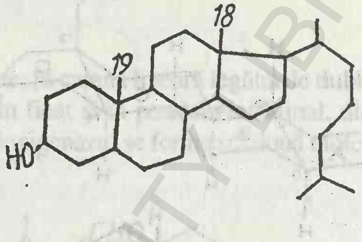
Colesterolul este o substanţă solidă, albă, insolubilă în apă. Are un caracter hidrofob pronunţat. Esterii colesterolului sunt printre cei mai hidrofobi constituenţi celulari.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Colesterolul are un rol structural, este prezent în majoritatea membranelor celulare şi în acelaşi timp este precursorul tuturor celorlalţi compuşi steroidici.

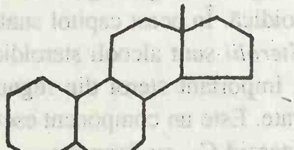
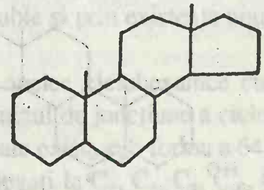
Alţi steroli, înrudiţi cu colesterolul sunt 7-dehidrocolesterolul (provitamina D_3) şi 5β - colestanolul:


7-Dehidrocolesterol

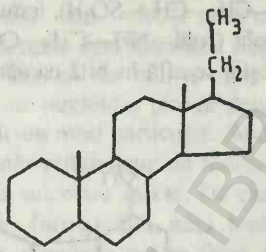
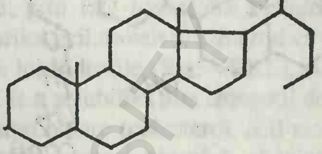
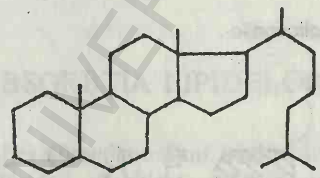

5β - Colestanol

Tabelul VIII.3.

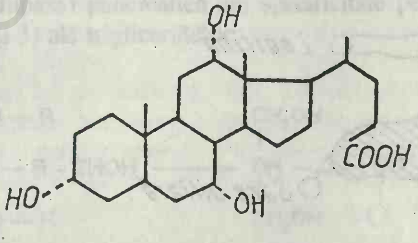
Principalele grupe de steroizi naturali şi hidrocarburile fundamentale din care derivă

Steroizi naturali	*Număr atomi de carbon*	*Hidrocarbura fundamentală*
Hormoni estrogeni	C_{18}	Estran 
Hormoni androgeni	C_{19}	Androstan 

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hormoni gestageni şi corticosteroizi	C_{21}	Pregnan 
Acizi biliari	C_{24}	Colan 
Steroli	C_{27}	Colestan 

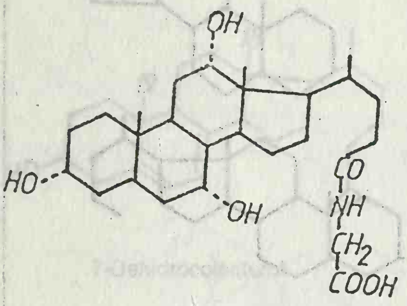
Acizii biliari sunt componenţi ai bilei. La pH-ul alcalin al bilei se găsesc sub formă de săruri biliare. Joacă roluri importante la solubilizarea şi absorbţia intestinală a lipidelor. Se formează din colesterol, sinteza şi eliminarea acizilor biliari prin fecale reprezintă o cale de excreţie a colesterolului. Sunt steroizi C_{24}. Ei derivă de la un acid ipotetic, acidul colanic. Acizii biliari sunt derivaţi hidroxilaţi ai acidului colanic, în una sau mai multe din poziţiile 3, 7 şi 12. Cel mai important acid biliar din bila omului este acidul colic (acid 3α, 7α, 12α -trihidroxicolanic):



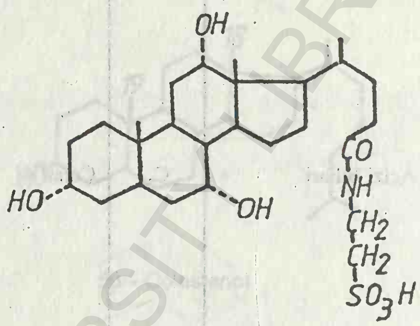
Alţi acizi biliari sunt: acidul chenodezoxicolic (acid 3α, 7α -dihidroxicolanic), acidul dezoxicolic (acid 3α, 12α -dihiroxicolanic), acidul litocolic (acid 3α-hidroxicolanic).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acizii biliari se află în bilă, sub formă de amide cu glicocolul (H_2N-CH_2-COOH) sau cu taurina ($H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H$), forme care sunt denumite acizi biliari conjugați. De exemplu acidul glicocolic (colil—NH—CH_2—COOH) și acidul taurocolic (colil—NH—CH_2—CH_2—SO_3H): Și aceștia se află în bilă ca săruri.



Acid glicocolic



Acid taurocolic

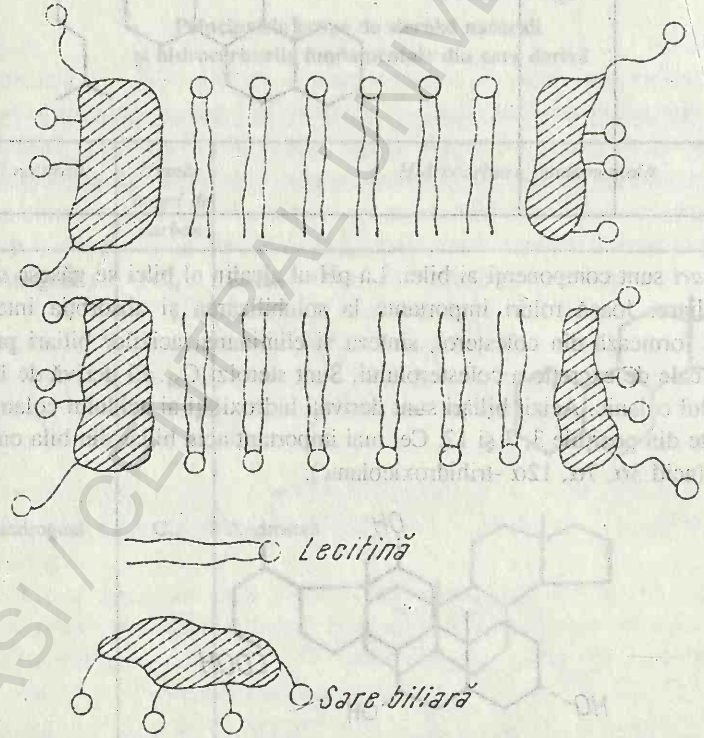


Fig. VIII. 2 - Structura unei micelii mixte lecitine-săruri biliare

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

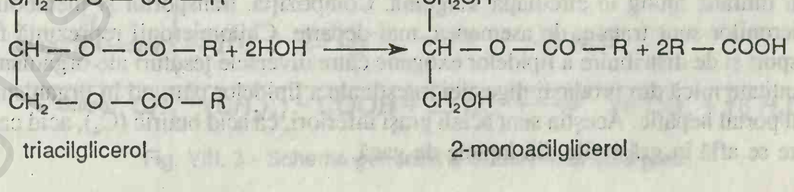
Acizii biliari liberi sau conjugaţi au proprietăţi unice de solubilitate. Cuprind grupări hidroxilice polare şi grupări cu sarcină negativă (—COO^- sau —SO_3^-) care conferă moleculelor caracter hidrofil, iar nucleul hidrocarbonat steranic este hidrofob. Regiunile hidrofilă şi hidrofobă ale moleculei au o dispoziţie diferită de cea a altor lipide amfipatice, la acizii biliari ele reprezintă cele două feţe ale nucleului plat al steranului. Sărurile biliare interacţionează cu apa şi cu alte lipide într-un mod particular. Se dizolvă în apă formând soluţii micelare prin agregarea unui număr relativ mic de molecule. În prezenţa altor lipide formează cu mare uşurinţă agregate micelare mixte. De exemplu, cu fosfatidilcoline (lecitine) formează agregate care iau forma unor mici bastonaşe. Moleculele de lecitină formează un cilindru bimolecular, grupările polare fiind dispuse la capete şi expuse spre exterior. Sărurile biliare, prin faţa hidrofobă a moleculelor, interacţionează cu catenele hidrocarbonate ale resturilor acil, învelesc cilindrul cu un strat de săruri biliare, care expun spre exterior grupările lor hidrofile (Fig. VIII.2.). Astfel de micelii mixte săruri biliare - lecitine au capacitatea de a solubiliza alte categorii de lipide, mai polare (acizi graşi, monogliceride) sau mai puţin polare (colesterol, acil-colesterol, trigliceride). Moleculele nepolare sunt incorporate în centrul hidrofob al miceliei iar lipidele amfipatice se intercalează în stratul superficial.

VIII.2. DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA LIPIDELOR

Principalele componente lipidice ale raţiei alimentare sunt trigliceridele (grăsimile propriu-zise), după care urmează fosfolipidele (lecitine, cefaline, sfingomieline), colesterolul liber şi acil-colesterolii. Carotenul şi vitaminele liposolubile (A, D, E şi K) sunt dizolvate în grăsimi şi un conţinut minimal de grăsimi în raţie este obligatoriu pentru absorbţia acestor compuşi. Digestia şi absorbţia lipidelor este un proces complex, pe lângă necesitatea degradării lor hidrolitice se mai adaugă problema solubilizării şi menţinerii într-un mediu apos a unor substanţe hidrofobe. Sărurile biliare, deversate cu bila în duoden, împreună cu unele lipide polare, au un rol esenţial în solubilizarea şi incorporarea lipidelor într-o formă uşor absorbabilă prin peretele intestinal.

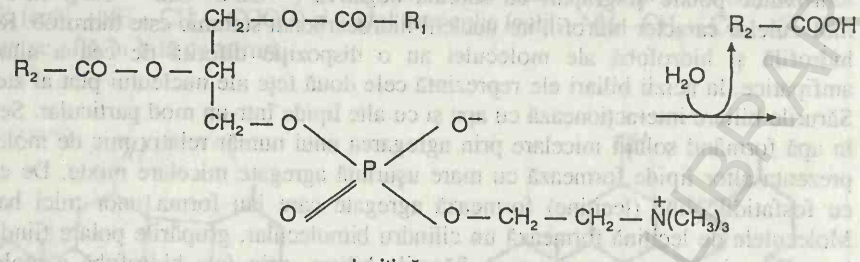
Lipidele alimentare când vin în contact cu bila, care cuprinde cantităţi importante de săruri biliare şi de lecitine, sunt dispersate sub forma unei soluţii coloidale (emulsie) cu un grad de dispersie mijlociu (diametrul particulelor este cuprins între 500 şi 1000 nm). Asupra grăsimilor emulsionate acţionează hidrolaze pancreatice specifice: lipazele asupra triacilglicerolilor, fosfolipaze asupra fosfatidelor, colesterolesteraza asupra esterilor colesterolului.

Lipaza (trigliceridlipaza) pancreatică are specificitate pentru legăturile esterice din poziţiile α şi α' (1 şi 3) ale trigliceridelor:

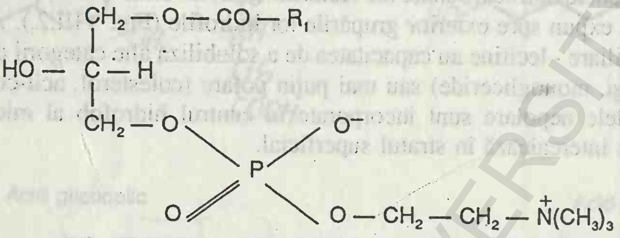


triacilglicerol 2-monoacilglicerol

Asupra fosfatidelor (a lecitinelor) acţionează fosfolipaze cu specificitate carboxiesterazică:



lecitină



lizolecitină

Lizolecitinele au proprietăţi detergente foarte puternice şi contribuie mai departe la solubilizarea lipidelor în intestin.

Colesterolul liber şi esterificat prezent în lumenul intestinal provine din trei surse: din alimente, din bilă şi din descuamaţiile mucoasei intestinale. Esterii colesterolului sunt hidrolizaţi sub acţiunea colesterol esterazei pancreatice.

Lipidele alimentare nehidrolizate şi produşii de hidroliză, insolubili sau parţial solubili în apă, împreună cu sărurile biliare, formează o soluţie micelară cu un grad de dispersie din ce în ce mai mic. Când agregatele micelare ating diametre de aproximativ 5 nm ele pătrund în spaţiile intervilozitare de la nivelul jejunului proximal şi lipidele din structura miceliilor sunt absorbite. Sărurile biliare rămân în lumen participând la solubilizarea şi transportul altor molecule lipidice. Abia în porţiunea distală a ileonului sărurile biliare sunt absorbite printr-un mecanism activ. Prin sistemul portal sărurile biliare ajung în ficat şi după unele remanieri ajung din nou în bilă şi intestin (circuit entero-hepatic).

În enterocite produşii de hidroliză, totală sau parţială, ai lipidelor servesc la reconstituirea moleculelor iniţiale, trigliceride, fosfatide, acil-colesteroli. Căile de sinteză a acestor compuşi sunt tratate mai departe. Aceste lipide, unele hidrofobe, altele polare, împreună cu cantităţi mici de proteine formează particule lipoproteice denumite chilomicroni. Aceste particule sunt secretate de enterocite în vasele chilifere şi prin sistemul limfatic ajung în circulaţia sanguină. Compoziţia, transportul şi metabolismul chilomicronilor sunt tratate, de asemenea, mai departe. Chilomicronii reprezintă forma de transport şi de distribuire a lipidelor exogene către diversele ţesuturi ale organismului.

O cantitate mică din produşii digestiei intestinale a lipidelor pătrund în organism prin sistemul portal hepatic. Aceştia sunt acizii graşi inferiori, ca acid butiric (C_4), acid caproic (C_6) care se află în grăsimile din laptele de vacă.

VIII.3. METABOLISMUL ACIZILOR GRAŞI

Componentele lipidice majore ale organismelor animale sunt trigliceridele. Sunt molecule energogene şi metabolismul lor, degradarea, sinteza, depozitarea şi transportul sunt subordonate acestei funcţii. Trigliceridele, în condiţii normale, acoperă aproximativ 40% din nevoile energetice ale organismului. De fapt acizii graşi, care reprezintă aproximativ 90% din greutatea unei triglicerid, au capacitatea de a înmagazina energie şi de a o elibera prin ardere. Celelalte categorii de lipide - fosfatide, sfingolipide, colesterol - pe lângă unele roluri structurale strict specifice, participă la vehicularea în cuprinsul organismului a trigliceridelor endogene şi exogene.

VIII.3.1. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A ACIZILOR GRAŞI

Acizii graşi formaţi prin hidroliza trigliceridelor exogene sau a celor endogene eliberează energia chimică potenţială înmagazinată în catenele lor hidrocarbonate prin ardere completă la dioxid de carbon şi apă. Acizii graşi sunt substratul energogen preferat al multor ţesuturi, ca miocard, muşchi scheletici. Creierul nu utilizează direct acizi graşi. În inaniţie când glucoza devine limitantă, în diabet, creierul utilizează ca sursă de energie corpii cetonici, care provin din acizi graşi. Eritrocitele, care nu au mitocondrii şi lanţ respirator, deasemenea, nu pot utiliza acizii graşi.

Arderea acidului palmitic (acidul gras saturat cel mai abundent din organism) are un efect energetic ridicat:

$$CH_3 - (CH_2)_{16} - COOH + 23\ O_2 \longrightarrow 16\ CO_2 + 16\ H_2O$$

$$\Delta G°' = -2340\ kcal$$

Comparativ cu arderea glucozei, acest $\Delta G°'$ este mult mai negativ. Dacă luăm în consideraţie energia liberă de reacţie pentru arderea a 100 g de substanţă:

glucoză ΔG = - 347 kcal/100 g

acid palmitic ΔG = - 914 kcal/100 g

Conţinutul caloric mediu al grăsimilor este de 9 kcal/g, faţă de 4 kcal/g pentru glucide şi tot atâta pentru proteine.

I β - oxidare

$$\left\{\begin{array}{l} CH_3 - (CH_2)_{14} - COOH + 8\ CoASH + 6\ H_2O \longrightarrow \\ 8\ CH_3 - CO - S - CoA + 28\ [H] \end{array}\right.$$

II Ciclul acizilor tricarboxilici

$$\left\{\begin{array}{l} 8\ CH_3 - CO - S - CoA + 24\ H_2O \longrightarrow \\ 16\ CO_2 + 8\ CoASH + 64\ [H] \end{array}\right.$$

III Lanţul respirator

$$\left\{ 92\ [H] + 23\ O_2 \longrightarrow 46\ H_2O \right.$$

Sumă:

$$CH_3 - (CH_2)_{14} - COOH + 23\ O_2 \longrightarrow 16\ CO_2 + 16\ H_2O$$

Fig. VIII. 3 - Schema generală a oxidării unui acid gras

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Arderea acizilor graşi în organismele vii este cuplată cu sinteza de ATP, randamentul global al procesului fiind de aproximativ 40%.

Oxidarea completă a unui acid gras se desfăşoară în trei etape (Fig. VIII.3). Prima etapă, β-oxidare, este specifică catabolismului acizilor graşi, pe când celelalte, ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator sunt căi oxidative terminale comune pentru toţi compuşii energogeni (glucide, lipide, proteine).

În etapa denumită β-oxidare molecula de acid gras suferă un atac oxidativ la atomul de carbon din poziţia β, urmat apoi de desprinderea unui fragment cu doi atomi de carbon sub formă de acetil-CoA. Prin repetarea de mai multe ori (de 7 ori în cazul acidului palmitic) a secvenţei β-oxidative, acidul gras este transformat în n/2 molecule de acetil-CoA (n fiind numărul de atomi de carbon ai acidului gras, un număr par). În această etapă, pe lângă acetil-CoA, sunt labilizaţi atomi de hidrogen şi transferaţi pe coenzime.

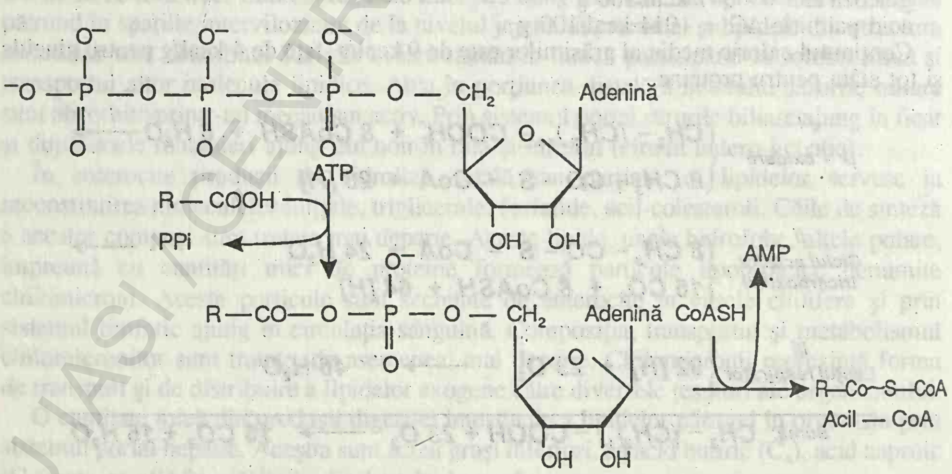
Etapa a doua corespunde degradării oxidative a resturilor acetil în ciclul acizilor tricarboxilici cu formare de CO_2 şi coenzime reduse. Procesul se încheie prin oxidarea coenzimelor reduse în lanţul respirator. Prin fosforilări oxidative energia este conservată în ATP. Oxidarea acidului palmitic este cuplată cu sinteza a 129 molecule ATP. β-oxidarea, reacţiile ciclului Krebs şi lanţul respirator sunt procese mitocondriale, asociate atât structural cât şi funcţional.

β-Oxidarea acizilor graşi (Ciclul sau spirala lui Lynen)

Activarea acizilor graşi. În toate procesele metabolice, fie catabolice, fie anabolice, acizii graşi participă ca esteri ai coenzimei A, acil-CoA sau R - CO ~ S - CoA. Activarea are loc în citosol (pe faţa citosolică a mitocondriilor) şi este catalizată de sintetaze denumite curent tiokinaze (acil CoA sintetaze):

$$R-COOH + CoASH + ATP \longrightarrow R-CO \sim SCoA + PP_i + AMP$$

Se formează intermediar un acil-adenilat, după care are loc transferul restului acil pe CoASH.



Acil adenilat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există tiokinaze cu specificcităţi pentru acizii superiori, mijlocii şi inferiori.

Transferul derivaţilor acil-CoA în mitocondrii. β-Oxidarea are loc în matrixul mitocondrial iar derivaţii acil-CoA se formează în citosol. Membrana internă a mitocondriilor, impermeabilă pentru acil-CoA constituie o barieră între cele două compartimente. Resturile acil sunt transferate în matrix prin funcţionarea unei navete la care participă carnitina şi două acil-transferaze localizate una pe faţa externă şi alta pe cea internă a membranei. Carnitina, β-hidroxi-γ-trimetilamoniu-butirat, are formula:

$$(CH_3)_3N^+ - CH_2 - \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}} - CH_2 - COO^-$$

şi poate forma esteri, acil-carnitină:

$$(H_3C)_3N^+ - CH_2 - \underset{\displaystyle O - CO - R}{\underset{|}{CH}} - CH_2 - COO^-$$

Membrana internă mitocondrială cuprinde o proteină transportatoare (translocază) care transportă cuplat acil-carnitina în matrix şi carnitina în sens invers (Fig. VIII.4.)

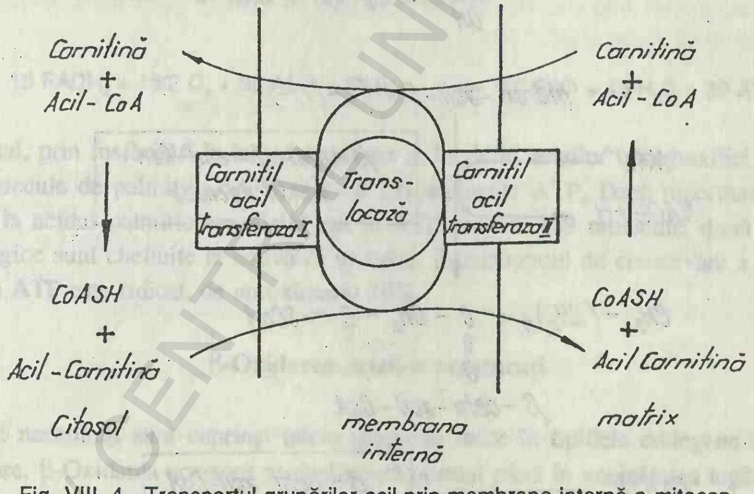


Fig. VIII. 4 - Transportul grupărilor acil prin membrana internă a mitocondriilor cu ajutorul carnitinei

β-Oxidarea acil-CoA constă în repetarea de n/2 - 1 a unei secvenţe de patru reacţii, două dehidrogenări separate de o reacţie de hidratare, prin care Cβ este transformat în grupare >C=O; urmează scindarea legăturii Cα - Cβ de către CoASH (tioliză) cu formare de acetil-CoA şi un derivat acil-CoA cu doi atomi de carbon mai puţin (Fig. VIII.5).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

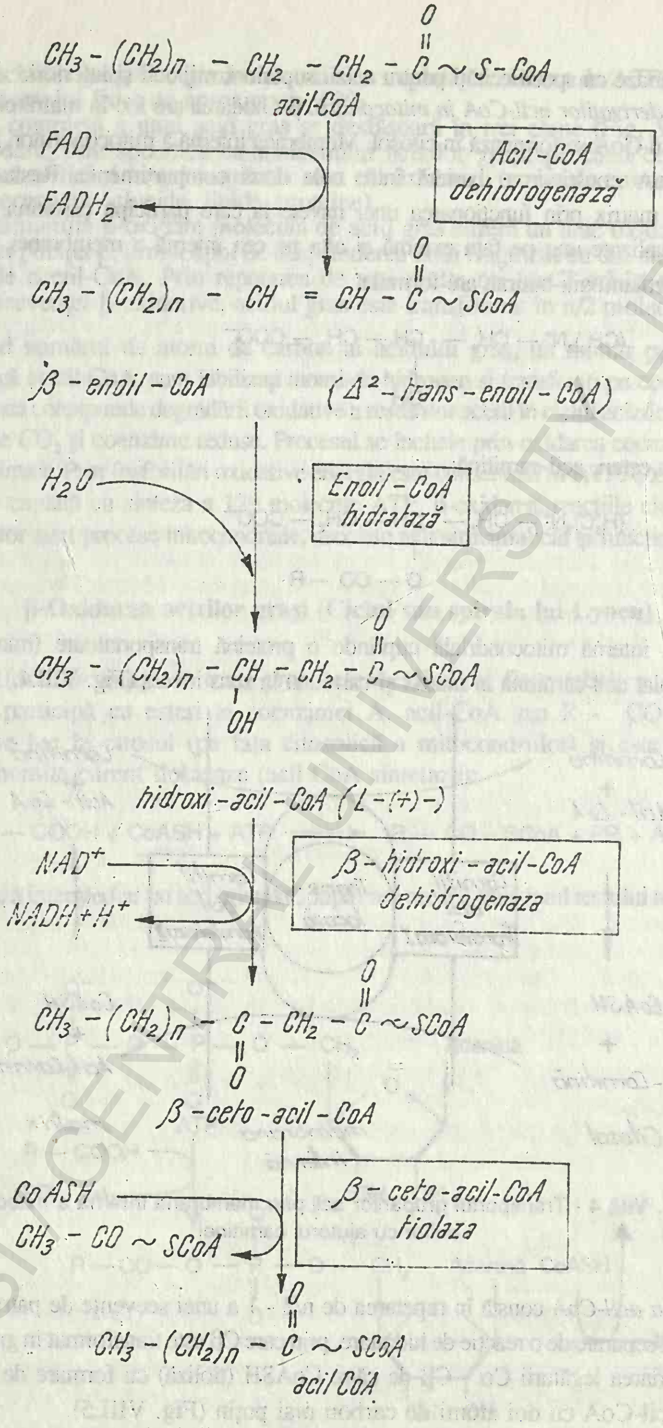


Fig. VIII. 5 - β- Oxidarea unui acil-CoA

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ecuaţia globală a unui ciclu β—oxidativ este:

$$CH_3 - (CH_2)_n - CH_2 - CH_2 - CO{\sim}SCoA + HOH + FAD + NAD^+ + CoASH \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CH_3 - (CH_2)_n - CO{\sim}S - CoA + 7\,FADH_2 + NADH + H^+ + CH_3COSCoA$$

Palmitil-CoA este degradat la acetil-CoA prin repetarea ciclului β-oxidativ de 7 ori:

$$Palmitil{-}CoA + 7\,CoASH + 7\,FAD + 7\,NAD^+ + 7\,H_2O \longrightarrow$$
$$8\,acetil{-}CoA + 7\,FADH_2 + 7\,NADH + 7\,H^+$$

Etapele terminale ale arderii unui acid gras includ ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator. Cele opt molecule de acetil—CoA formate prin β-oxidarea palmitil-CoA, în ciclul Krebs devin:

$$8\,CH_3CO{\sim}SCoA + 16\,H_2O + 24\,NAD^+ + 8\,FAD + 8\,ADP + 8\,P_i \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 16\,CO_2 + 24\,NADH + 24\,H^+ + 8\,FADH_2 + 8\,ATP + 8\,CoASH$$

Coenzimele $FADH_2$ şi NADH care se formează atât prin β-oxidare cât şi în ciclul Krebs sunt oxidate în lanţul respirator cu sinteză cuplată de ATP:

$$31\,NADH + 31\,H^+ + 31/2\,O_2 + 93\,ADP + 93\,P_i \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 31\,NAD^+ + 124\,H_2O + 93\,ATP$$

şi

$$15\,FADH_2 + 15/2\,O_2 + 30\,ADP + 30\,P_i \longrightarrow 15\,FAD + 45\,H_2O + 30\,ATP$$

În total, prin fosforilări în lanţul respirator şi în ciclul acizilor tricarboxilici, arderea unei molecule de palmitil-CoA generează 131 molecule ATP. Dacă raportăm această valoare la acidul palmitic beneficiul net în ATP este de 129 molecule, două legături macroergice sunt cheltuite la activarea acidului. Randamentul de conservare a energiei libere în ATP este ridicat, de aproximativ 40%.

β-Oxidarea acizilor nesaturaţi

Acizii nesaturaţi sunt cuprinşi intr-o proporţie mare în lipidele endogene sau cele alimentare. β-Oxidarea acestora se desfăşoară normal până în vecinătatea legăturii sau legăturilor duble originale.

Pentru a depăşi unele obstacole pe care le ridică configuraţiile cis ale legăturilor etilenice din acizii graşi nesaturaţi, ca şi poziţiile acestora în intermediarii β-oxidării sunt necesare reacţii auxiliare, catalizate enzimatic.

În cazul β-oxidării acidului oleic (a oleil-CoA) după 3 cicluri de β-oxidare se ajunge la un cis - Δ^3 - enoil - CoA. În acest moment intervine o enzimă auxiliară care prin izomerizarea cis → trans şi migrarea dublei legături determină formarea trans - Δ^2 - enoil - CoA, intermediar normal al β-oxidării (Fig. VIII.6).

BOUASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

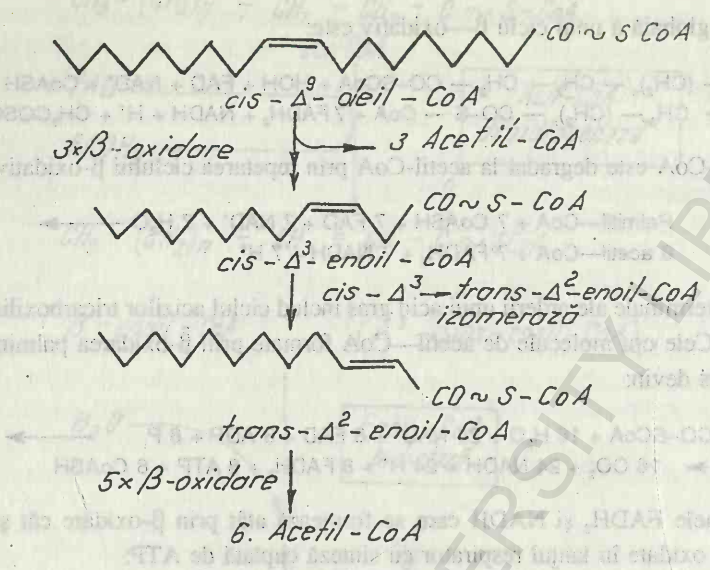


Fig. VIII. 6 - β-Oxidarea oleil-CoA

β-Oxidarea unui acid polietilenic implică mai multe reacţii particulare. În fig. VIII.7 este arătată β-oxidarea linoleil-CoA.

Oxidarea acizilor graşi în peroxizomi

În afara β-oxidării mitocondriale, acizii graşi, în special aceia cu catenă lungă, pot fi oxidaţi la acetil-CoA în peroxizomi (Lazarow şi de Duve, 1976). Aceste organite sunt prezente în toate tipurile de celule eucariote, au diametre de aproximativ o,5 nm şi cuprind o membrană simplă. Peroxizomii sunt sediul oxidării multor compuşi endogeni sau exogeni, oxidări catalizate de oxidaze cu producţie de apă oxigenată, conform ecuaţiei:

$$SH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{oxidază}} S_{ox} + H_2O_2$$

Mai departe, apa oxigenată este fie descompusă, sub acţiunea catalazei, enzimă abundentă în peroxizomi:

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

fie, serveşte ca oxidant în reacţii catalizate de peroxidaze:

$$S'H_2 + H_2O_2 \longrightarrow S'_{ox} + 2\,H_2O$$

Oxidarea acizilor graşi în peroxizomi conduce la acetil-CoA (este o β-oxidare). Acetil-CoA difuzează din peroxizomi în mitocondrii unde este oxidată la CO_2 şi H_2O cu sinteză cuplată de ATP sau este convertită în corpi cetonici.

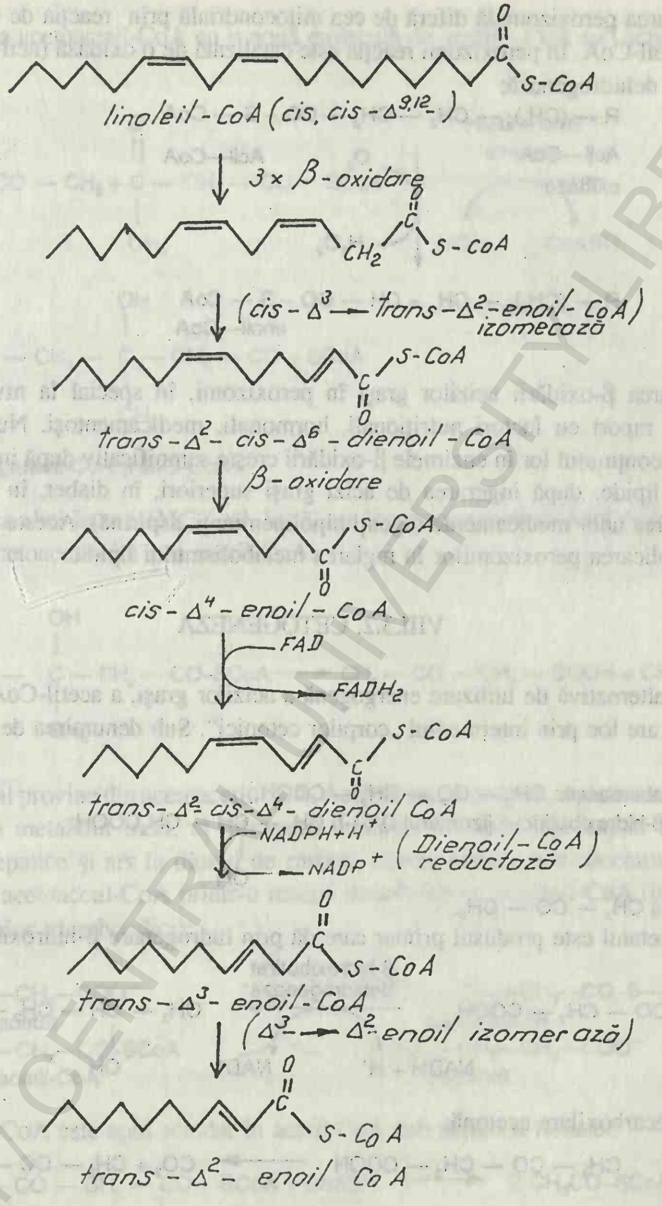


Fig. VIII. 7 - β-Oxidarea linoleil-CoA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

β-Oxidarea peroxizomală diferă de cea mitocondrială prin reacţia de oxidare a acil-CoA la enoil-CoA. În peroxizomi reacţia este catalizată de o oxidază (acil-CoA oxidază) şi nu de o dehidrogenază:

$$R-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-CO\sim S-CoA$$

$$\xrightarrow[\text{Acil-CoA oxidază}]{O_2 \rightarrow H_2O_2}$$

$$R-(CH_2)_n-CH=CH-CO\sim S-CoA$$

enoil—CoA

Amploarea β-oxidării acizilor graşi în peroxizomi, în special la nivelul ficatului, variază în raport cu factori nutriţionali, hormonali, medicamentoşi. Numărul peroxizomilor şi conţinutul lor în enzimele β-oxidării creşte semnificativ după ingestia de diete bogate în lipide, după ingerarea de acizi graşi superiori, în diabet, în inaniţie, după administrarea unor medicamente (agenţi hipolipemianţi, aspirină). Aceste fapte pledează pentru implicarea peroxizomilor în reglarea metabolismului lipidic.

VIII.3.2. CETOGENEZA

O cale alternativă de utilizare energogenă a acizilor graşi, a acetil-CoA formată prin β-oxidare, are loc prin intermediul „corpilor cetonici". Sub denumirea de corpi cetonici se înţeleg:

- acidul acetoacetic $CH_3-CO-CH_2-COOH$;
- acidul β-hidroxibutiric, [izomerul D (-)-] $CH_3-CH(OH)-CH_2COOH$;
- acetona $CH_3-CO-CH_3$.

Acetoacetatul este produsul primar care dă prin hidrogenare β-hidroxibutirat:

$$CH_3-CO-CH_2-COOH \xrightarrow[NADH + H^+ \rightarrow NAD^+]{\beta\text{-hidroxibutirat dehidrogenaza}} CH_3-CH(OH)-CH_2-COOH$$

sau prin decarboxilare acetonă:

$$CH_3-CO-CH_2-COOH \longrightarrow CO_2 + CH_3-CO-CH_3$$

Sinteza de acetoacetat (cetogeneza) are loc, în mitocondriile hepatice, din acetil-CoA formată prin β-oxidarea acizilor graşi. Procesul decurge astfel:

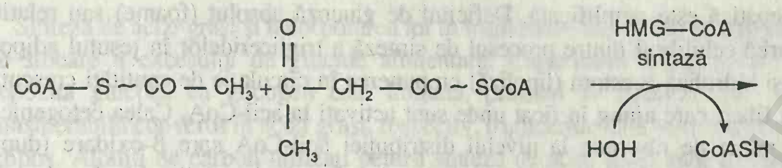
- condensarea a două molecule de acetil-CoA sub acţiunea tiolazei:

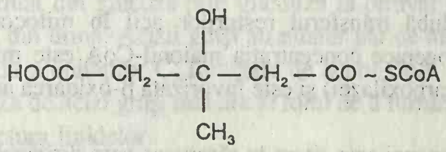
$$CH_3-CO\sim SCoA + CH_3-CO\sim SCoA \xrightarrow[\rightarrow CoASH]{} CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA$$

Acetoacetil-CoA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

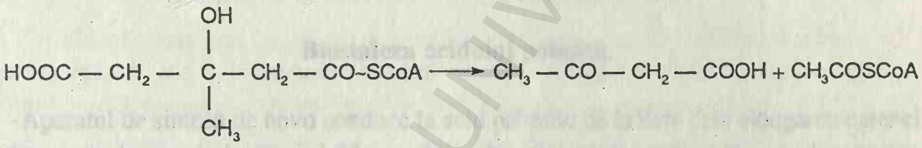
- condensarea acetoacetil-CoA cu o nouă moleculă de acetil - CoA sub acţiunea unei sintaze:



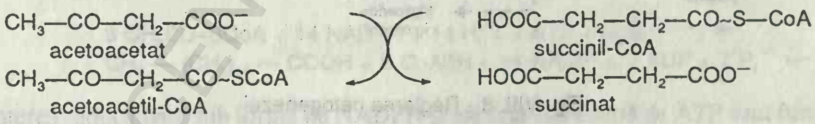


Hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA)

- sub acţiunea altei liaze (HMG-CoA liază) are loc reacţia inversă celei de mai înainte cu eliberarea acetoacetatului şi a acetil-CoA:



Acetoacetatul provine din acetoacetil-CoA. Acetoacetatul ca atare, neactivat, reprezintă pentru ficat un metabolit inert, el difuzează în sânge de unde este captat de diverse ţesuturi extrahepatice şi ars la dioxid de carbon. Pentru aceasta acetoacetatul este mai întâi activat la acetoacetil-CoA printr-o reacţie de schimb cu succinil-CoA (intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici):



Acetoacetil-CoA este apoi scindat în acetil-CoA sub acţiunea tiolazei:

$$CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA + CoASH \longrightarrow 2\ CH_3CO\sim SCoA$$

Acetil-CoA mai departe este oxidată în ciclul Krebs şi lanţul respirator. Ficatul nu poate metaboliza acidul acetoacetic (corpii cetonici) întrucât nu posedă echipamentul enzimatic necesar activării acestuia.

Acetoacetatul (şi β-hidroxibutiratul) este utilizat energogen de către miocard, muşchii scheletici, diafragm, rinichi, creier etc. Prin cetogeneză creierul devine apt să utilizeze energogen rezervele lipidice ale organismului.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cetogeneza în condiţii de alimentaţie normală este redusă. Cetonemia nu depăşeşte 1 mg/dl. Când disponibilităţile de glucoză scad, în foame, diabet, gestaţie târzie (nevoile metabolice ale fătului sunt mari), în lactaţie (se consumă glucoză pentru sinteza lactozei) cetogeneza hepatică este amplificată. Deficitul de glucoză absolut (foame) sau relativ (diabet) perturbă echilibrul dintre procesul de sinteză a trigliceridelor în ţesutul adipos (lipogeneză) şi hidroliza acestora (lipoliză) cu punerea în circulaţie de cantităţi crescute de acizi graşi liberi care ajung în ficat unde sunt activaţi la acil-CoA. Calea cetogenică are un prim punct de răscruce la nivelul distribuţiei acil-CoA spre β-oxidare (după transfer în mitocondrii via acil-carnitină) sau spre sinteză de trigliceride în citosol. Malonil-CoA (vezi mai departe) inhibă transferul resturilor acil în mitocondrii şi blochează β-oxidarea. În condiţii cetogenice concentraţia malonil-CoA este mică (din lipsă de citrat activator al acetil-CoA carboxilazei) şi este favorizată β-oxidarea acil-CoA la acetil-CoA.

Al doilea punct de control al cetogenezei este situat la răscrucea care dirijează acetil-CoA spre sinteză de acetoacetat sau spre oxidare în ciclul Krebs. Amorsarea ciclului are loc prin sinteză de citrat din acetil-CoA şi oxaloacetat. Disponibilităţile de oxaloacetat (care se formează din glucoză) vor stabili balanţa dintre cetogeneză şi ardere mitocondrială. În absenţa glucozei oxaloacetatul este deficitar şi este favorizată cetogeneza (Fig. VII.8).

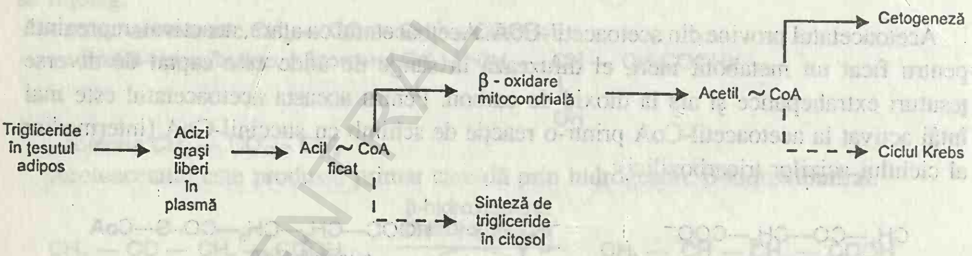


Fig. VIII. 8 - Reglarea cetogenezei

În diabetul netratat cetogeneza este exacerbată, cetonemia poate atinge valori ridicate, este depăşită capacitatea ţesuturilor extrahepatice de a arde corpii cetonici (la cetonemii de aproximativ 70 mg/dl) şi apare cetonuria. Acidul acetoacetic şi β-hidroxibutiric sunt eliminaţi ca săruri, ei consumă din rezerva alcalină a organismului conducând la acidoză. Totodată fiind substanţe osmotic active antrenează şi pierderi mari de apă (poliurie), deshidratarea organismului.

VIII.3.3. BIOSINTEZA ACIZILOR GRAŞI

Sinteza de acizi graşi şi încorporarea lor în trigliceride constituie mecanismul principal de stocare a excesului de glucide alimentare. Capacitatea organismului uman de a depozita glucoza ca glicogen este limitată, prisosul de glucide este într-o măsură considerabilă convertit în acizi graşi, respectiv, trigliceride care sunt depozitate în ţesutul adipos. Atomii de carbon utilizaţi pentru sinteza de acizi graşi sunt furnizaţi de acetil-CoA format din glucoză prin glicoliză la piruvat urmată de decarboxilarea oxidativă a acestuia din urmă. Acizii graşi au număr par de atomi de carbon, ei rezultă prin legarea cap-coadă a unităţilor C_2 furnizate de acetil-CoA.

Sinteza de acizi graşi mai are şi rolul de a furniza organismului întreaga gamă de acizi din structura lipidelor.

Biosinteza acizilor graşi cuprinde mai multe procese:

- sinteza „de novo" cu formare de acid palmitic;
- elongarea acidului palmitic nou sintetizat sau a unor acizi graşi endogeni sau exogeni;
- introducere de legături duble în acizi graşi endogeni sau exogeni.

Biosinteza acidului palmitic

Aparatul de sinteză de novo conduce la acid palmitic de la care prin elongarea catenei şi/sau introducere de legături duble se obţin alţi acizi graşi, acid stearic, acid palmitic, acid oleic, acid lignoceric etc.

Sinteza acidului palmitic are loc în citosol cu participarea unei proteine multienzimatice - acid gras sintază. Majoritatea ţesuturilor dispun de acest echipament, totuşi ficatul deţine rolul principal în sinteza de novo a acidului palmitic. Acetil-CoA rezultă din glucoză. Procesul este intens reductiv (necesită NADPH) şi endergonic (necesită ATP). Ecuaţia globală a biosintezei acidului palmitic este:

$$8\ CH_3CO{\sim}SCoA + 14\ NADPH + 14\ H^+ + 7\ ATP + H_2O \longrightarrow CH_3-(CH_2)_{14}-COOH + 8\ CoASH + 14\ NADP^+ + 7\ ADP + 7\ P_i$$

Puterea reducătoare sub formă de NADPH şi energia sub formă de ATP sunt furnizate, de asemenea, de glucoză.

Transferul acetil-CoA din mitcondrii în citosol. Transformarea glucozei în acetil-CoA are loc în matrixul mitocondrial şi sinteza de acid gras este un proces citosolic. Membrana internă a mitocondriilor este nepenetrabilă pentru acetil-CoA şi traversarea acestei bariere implică următoarele reacţii (Fig. VIII.9):

- în mitocondrii, acetil-CoA se condensează cu oxaloacetat şi rezultă citrat (sub acţiunea citrat sintazei);
- citratul este translocat în citosol şi apoi este scindat în acetil-CoA şi oxaloacetat într-o reacţie ATP-dependentă (sub acţiunea citrat liazei);

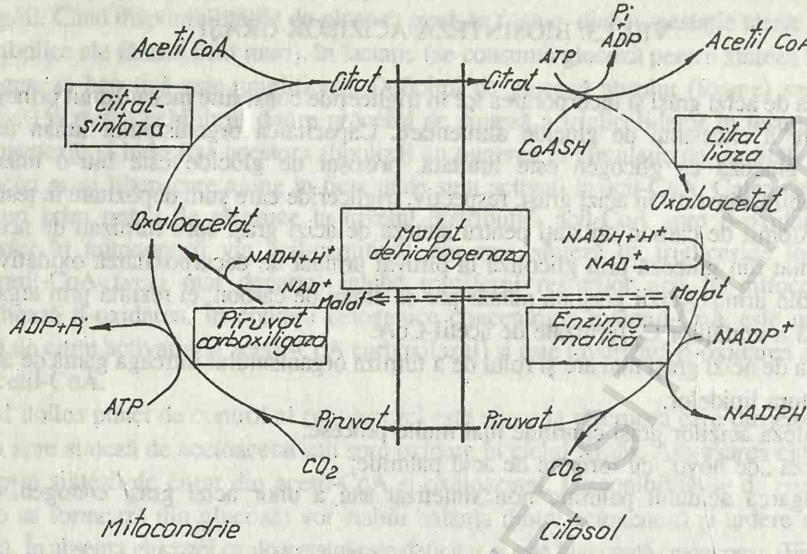
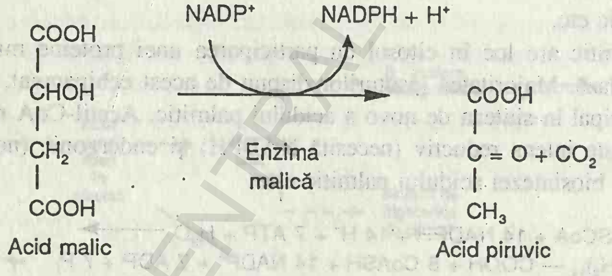


Fig. VIII. 9 - Transportul acetil CoA din mitocondrii în citosol

- oxaloacetatul este redus la malat sub acţiunea malat dehidrogenazei citosolice;
- malatul are două posibilităţi de evoluţie, trece în mitocondrii şi prin dehidrogenare regenerează oxaloacetat sau, în citosol, suferă o decarboxilare reductivă sub acţiunea „enzimei malice":



Piruvatul trece în mitocondrii unde prin carboxilare generează oxaloacetat. Această din urmă cale de utilizare a malatului este deosebit de importantă, ea furnizează o fracţiune din NADPH necesar etapelor reductive ale sintezei de acid gras.

Transferul acetil-CoA în citosol, în vederea încorporării în acizi graşi, depinde de disponibilităţile celulare de oxaloacetat (care se formează din piruvat), de citrat, de ATP şi acestea sunt mari în perioadele de aport glucidic crescut, când ciclul Krebs este saturat şi se acumulează citrat, ATP şi oxaloacetat.

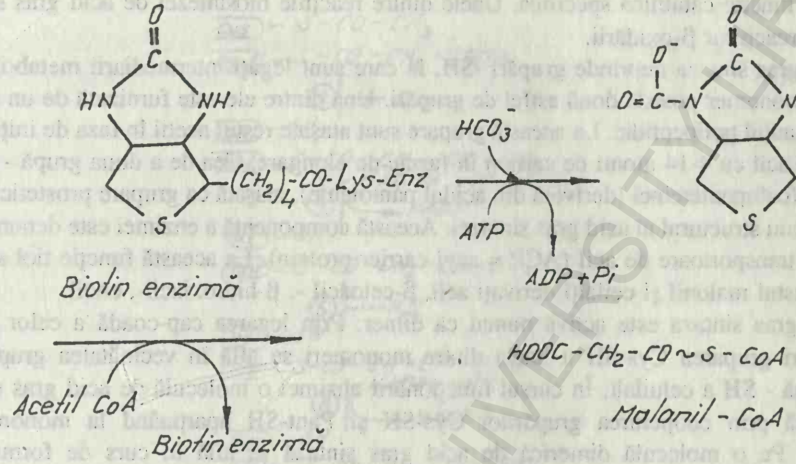
Sinteza malonil-CoA. Deşi acetil-CoA furnizează toţi atomii de carbon din acidul palmitic totuşi procesul de biosinteză necesită obligatoriu dioxid de carbon (HCO_3^-). Acesta din urmă carboxilează acetil-CoA la malonil-CoA:

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$CH_3 - CO\sim SCoA + HCO_3^- + ATP \longrightarrow HOOC - CH_2CO\sim SCoA + ADP + P_i$$

malonil—CoA

Reacţia este catalizată de acetil-CoA carboxilază (carboxiligază), o enzimă care cuprinde biotină. Reacţia are loc în două etape:



Reacţia catalizată de acetil-CoA carboxilaza este etapa cheie, reglatoare a biosintezei acidului palmitic, ea dirijează acetil-CoA pe această cale metabolică. Acetil-CoA carboxilaza există ca monomer cu activitate catalitică redusă sau ca polimer activ. Deasemenea, enzima posedă situsuri la care se pot lega resturi fosforil sub acţiunea protein kinazei A, AMP_c - dependentă. În plus, cantitatea de enzimă din ficat variază în funcţie de starea hormonală şi de starea de nutriţie a organismului. Principalii factori reglatori ai acetil-CoA carboxilazei sunt:

Concentraţia citratului. Acumularea de citrat în celule, în citosol, acţionează pozitiv asupra acetil-CoA carboxilazei (favorizează polimerizarea). Acest metabolit semnalizează gradul de saturare cu substrat a ciclului acizilor tricarboxilici şi, indirect, încărcarea energetică celulară.

Palmitil-CoA şi alţi acil-CoA cu catenă lungă acţionează ca efectori negativi, ei favorizează trecerea enzimei în forma monomerică, cu activitate redusă. Acumularea în celule a acestor metaboliţi semnalizează prezenţa unui exces de acizi graşi.

Starea hormonală a organismului, raportul insulină/glucagon, are un rol hotărâtor în modularea activităţii acetil-CoA carboxilazei. Insulina are efect activator asupra enzimei, din contră, glucagonul favorizează conversia enzimei în forma fosforilată mai puţin activă. Perioadele de alimentare glucidică, caracterizate printr-un raport insulină/glucagon ridicat, sunt favorabile conversiei glucozei în acizi graşi. Adrenalina şi noradrenalina, prin creşterea concentraţiei AMP_c şi activarea protein kinazei A, inhibă acetil-CoA carboxilaza.

Cantitatea de enzimă în ficat este reglată de starea de nutriţie. În perioadele de

Cantitatea de enzimă în ficat este reglată de starea de nutriţie. În perioadele de alimentaţie glucidică sinteza acetil-CoA carboxilazei este ridicată. Din contră, în foame cantitatea de enzimă este mult diminuată.

Acid gras sintaza catalizează sinteza acidului palmitic. Este o enzimă, multifuncţională. La mamifere este o proteină uriaşe (50 kd) alcătuită din două lanţuri polipeptidice identice. Un monomer este organizat în mai multe domenii structurale, fiecare domeniu având o funcţie catalitică specifică. Unele dintre reacţiile biosintezei de acid gras sunt inversul reacţiilor β-oxidării.

Acid gras sintaza cuprinde grupări -SH, la care sunt legaţi intermediarii metabolici. Fiecare monomer posedă două astfel de grupări. Una dintre ele este furnizată de un rest Cys din lanţul polipeptidic. La această grupare sunt ataşate restul acetil în faza de iniţiere şi resturi acil cu 4-14 atomi de carbon în fazele de elongare. Cea de a doua grupă - SH aparţine fosfopanteteinei (derivată din acidul pantotenic), ataşată ca grupare prostetică la un domeniu structural al acid gras sintazei. Această componentă a enzimei este denumită proteina transportoare de acil (ACP = acyl carrier protein). La această funcţie tiol sunt ataşaţi restul malonil şi ceilalţi derivaţi acil, β-cetoacil -, β-hidroxiacil-, enoil.

Acid gras sintaza este activă numai ca dimer. Prin legarea cap-coadă a celor doi monomeri gruparea Cys-SH a uneia dintre monomeri se află în vecinătatea grupării panteteină - SH a celuilalt. În cursul funcţionării enzimei o moleculă de acid gras este sintetizată prin cooperarea grupărilor Cys-SH şi Pant-SH aparţinând la monomeri distincţi. Pe o moleculă dimerică de acid gras sintază se află în curs de formare, simultan, două molecule de acid palmitic. În fig. VIII.10 este descrisă sinteza unei molecule de acid palmitic cu participarea unei jumătăţi a dimerului, reprezentat astfel:

[ ]— Cys - SH
[ ]— Pant - SH

Reacţiile care au loc sunt:

1. Un rest acetil din acetil-CoA este transferat pe gruparea Cys-SH. Enzima care catalizează reacţia este o transacilază.

2. Un rest malonil din malonil-CoA este transferat pe gruparea tiolică a fosfopanteteinei. Se pare că o aceeaşi transacilază catalizează reacţiile 1 şi 2.

3. Gruparea acetil, în faza de iniţiere sau o grupare acil a acidului gras intermediar în fazele de elongare, atacă gruparea metilen activă din restul malonil. Simultan are loc o decarboxilare şi formarea unui derivat β-cetoacil. În prima fază a procesului se formează un β-cetoacil cu 4 C.

4. Urmează reducerea derivatului β-cetoacil la β-hidroxiacil într-o reacţie NADPH dependentă.

5. Derivatul β-hidroxiacil prin eliminare de apă trece într-un derivat tiolesteric al acidului α, β nesaturat (enoil-)

6. Hidrogenarea, NADPH - dependentă, a derivatului enoil - duce la formarea unui acid gras saturat, ca derivat tiolesteric. În prima fază a procesului se formează acid butiric şi apoi acizii graşi cu 6, 8 ...., 16 atomi de carbon.

7. Acizii graşi cuprinzând 4 până la 14 atomi de carbon nu sunt eliberaţi de pe acid gras sintază. Numai acidul palmitic este detaşat hidrolitic din legătura sa tiolesterică la

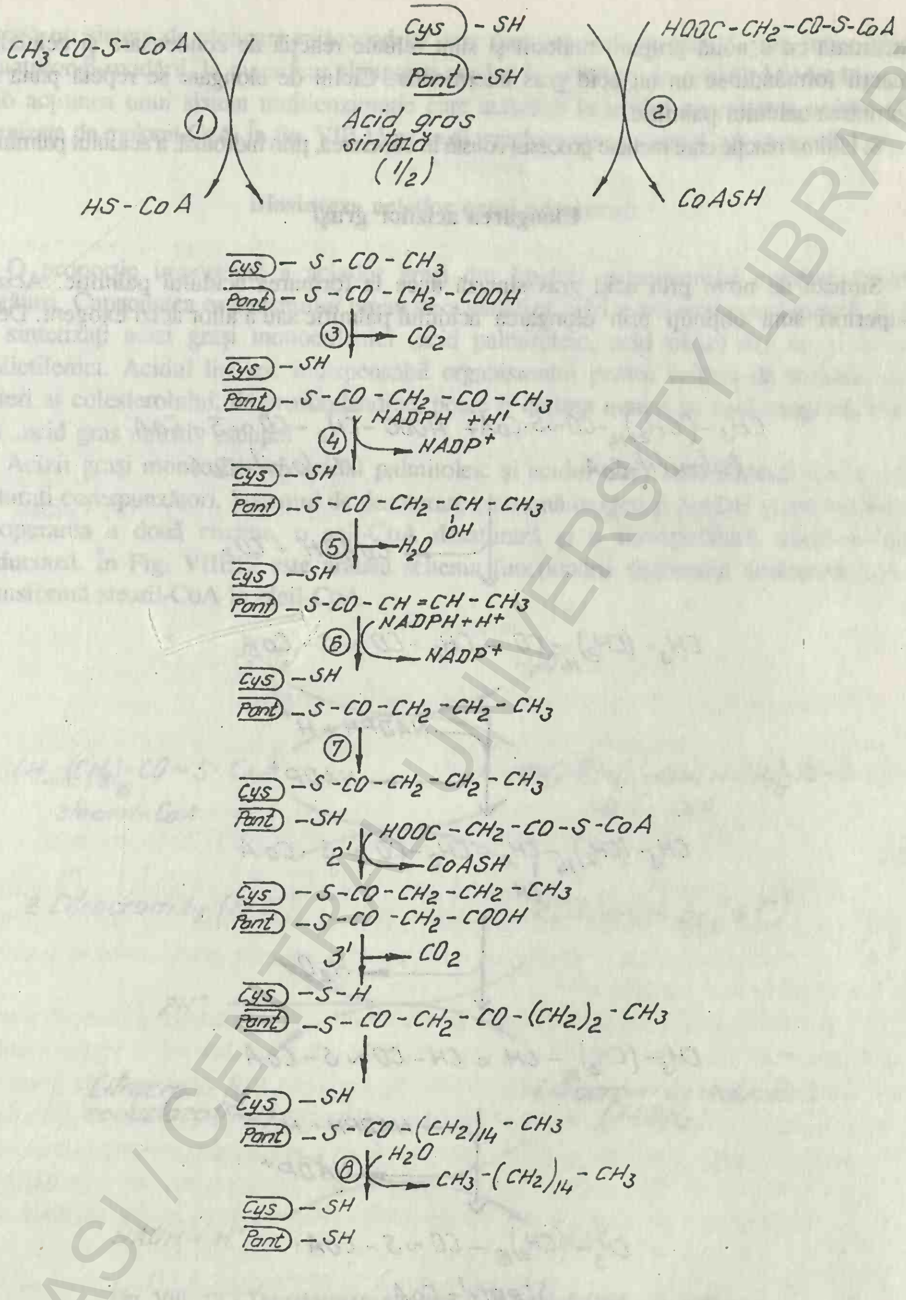


Fig. VIII. 10 - Biosinteza acidului palmitic

Pant-SH. Grupările acil ale acizilor graşi intermediari (4-14 C) sunt transferaţi de pe gruparea tiolică a panteteinei la gruparea Cys-SH vecină. Gruparea Pant-SH eliberată este

încărcată cu o nouă grupare malonil şi sunt reluate reacţia de condensare şi celelalte reacţii formându-se un alt acid gras intermediar. Ciclul de elongare se repetă până la formarea acidului palmitic.

8. Ultima reacţie care încheie procesul constă în eliberarea, prin hidroliză, a acidului palmitic.

Elongarea acizilor graşi

Sinteza de novo prin acid gras sintază duce la formarea acidului palmitic. Acizii superiori sunt obţinuţi prin elongarea acidului palmitic sau a altor acizi exogeni. Deşi

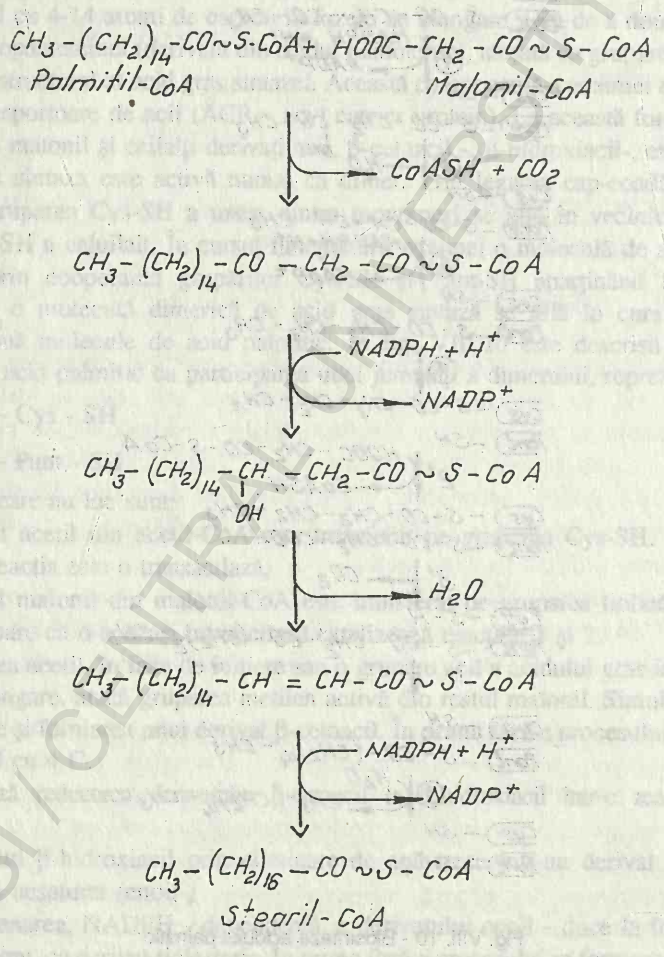


Fig. VIII. 11 - Elongarea palmitil-CoA la stearil-CoA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

există un sistem de elongare mitocondrial care funcţionează, în esenţă, prin inversarea reacţiilor β-oxidării, la mamifere elongarea are loc în principal în reticulul endoplasmic sub acţiunea unui sistem multienzimatic care ataşează la acidul preexistent unităţi C_2 furnizate de malonil-CoA. În fig. VIII.11 se arată transformarea palmitil-CoA în stearil-CoA.

Biosinteza acizilor graşi nesaturaţi

O proporţie importantă a acizilor graşi din lipidele organismului cuprind duble legături. Capacitatea organismului uman de a sintetiza acizi nesaturaţi este limitată. Pot fi sintetizaţi acizi graşi monoetilenici (acid palmitoleic, acid oleic) dar nu şi acizi polietilenici. Acidul linoleic indispensabil organismului pentru sinteza de lecitine, de esteri ai colesterolului, de prostaglandine, poate fi obţinut numai pe cale exogenă, este un „acid gras nutritiv esenţial"

Acizii graşi monoetilenici, acidul palmitoleic şi acidul oleic sunt obţinuţi din acizii saturaţi corespunzători. Sistemul de desaturare consumă oxigen şi NADH şi are loc prin cooperarea a două enzime, o acil-CoA desaturază şi o flavoproteină, citocrom b_5 reductază. În Fig. VIII.12 este arătată schema funcţionării sistemului desaturant care transformă stearil-CoA în oleil-CoA.

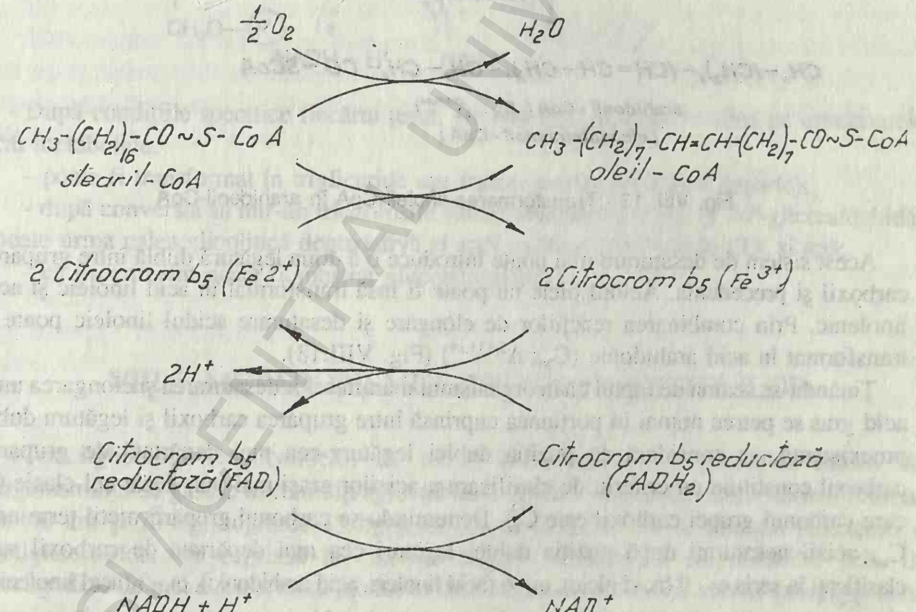


Fig. VIII. 12 - Transformarea stearil-CoA în oleil-CoA sub acţiunea sistemului desaturant al acizilor graşi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-CO\sim SCoA$$

linoleil - CoA (C_{18} : $\Delta^{9,12}$)

$\downarrow$ *desaturare*

$$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_4-CO\sim SCoA$$

C_{18} : $\Delta^{6,9,12}$

$\downarrow$ *elongare*

$$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_6-CO\sim SCoA$$

C_{20} : $\Delta^{8,11,14}$

$\downarrow$ *desaturare*

$$CH_3-(CH_2)_4-(CH=CH-CH_2)_4-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA$$

arahidonil - CoA (C_{20} : $\Delta^{5,8,11,14}$)

(eicosatetraenoil - CoA)

Fig. VIII. 13 - Transformarea linoleil-CoA în arahidonil-CoA

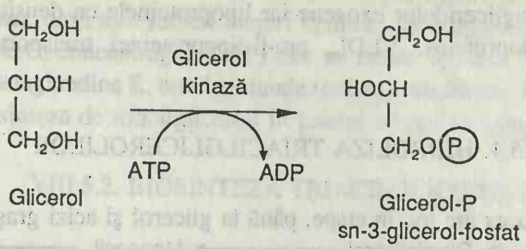
Acest sistem de desaturare mai poate introduce o a doua legătură dublă între gruparea carboxil şi precedenta. Acidul oleic nu poate fi însă transformat în acid linoleic şi acid linolenic. Prin combinarea reacţiilor de elongare şi desaturare acidul linoleic poate fi transformat în acid arahidonic (C_{20}: $\Delta^{5,8,11,14}$) (Fig. VIII.13).

Ţinându-se seama de faptul că în organismul mamiferelor desaturarea şi elongarea unui acid gras se petrec numai în porţiunea cuprinsă între gruparea carboxil şi legătura dublă preexistentă, se consideră că poziţia dublei legături cea mai depărtată de gruparea carboxil constituie un criteriu de clasificare a acizilor graşi mai bun decât cel clasic (în care carbonul grupei carboxil este C_1). Denumindu-se carbonul grupării metil terminale C_ω, acizii nesaturaţi după poziţia dublei legături cea mai depărtată de carboxil sunt clasificaţi în seria ω - 9 (acid oleic), ω - 6 (acid linoleic, acid arahidonic), ω - 3 (acid linolenic).

VIII.4. METABOLISMUL GLICEROLULUI

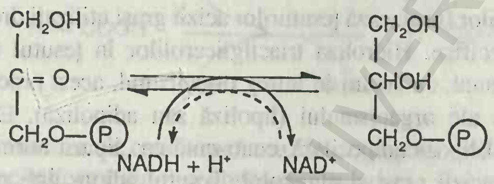
Glicerolul este component al gliceridelor şi al fosfogliceridelor. Liber se formează prin hidroliza tisulară a trigliceridelor. Pentru ca glicerolul să reintre în fluxul metabolic el este mai întâi fosforilat la glicerol fosfat sub acţiunea glicerol kinazei:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Această enzimă este foarte activă în ficat dar este practic absentă în adipocite. Glicerolul format în ţesutul adipos difuzează în plasmă de unde este captat de ficat care îl utilizează după conversie în glicerol fosfat.

Glicerol fosfatul mai poate fi obţinut din glucoză, din intermediarul glicolitic dihidroxiacetonă fosfat, prin reacţia reversibilă:



După condiţiile specifice fiecărui ţesut, glicerol fosfatul poate evolua pe următoarele căi metabolice:

- poate fi transformat în trigliceride sau fosfogliceride (vezi mai departe);
- după conversia sa într-un triozofosfat (dihidroxiacetonă fosfat şi 3-P-gliceraldehidă) poate urma calea glicolitică degradativă şi apoi oxidare completă la CO_2 şi apă;
- ca triozofosfat poate fi substrat gluconeogenetic.

VIII.5. METABOLISMUL TRIACILGLICEROLILOR

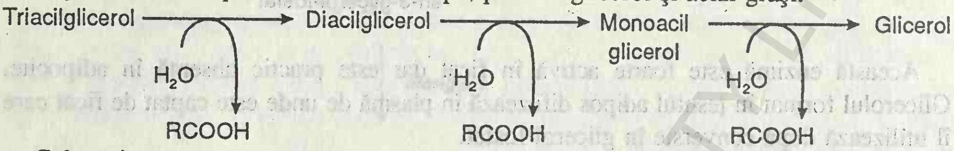
Triacilglicerolii (trigliceridele) ca formă de depozitare a excesului caloric al organismului se găsesc în cantităţi apreciabile în ţesutul adipos. Un adult normal (bărbat de 40 ani şi 70 kg) cuprinde 15 kg ţesut adipos (135.000 kcal). Energia potenţială a acilglicerolilor este cuprinsă în catenele bogate în hidrogen ale resturilor acil. În paragrafele de mai sus s-a tratat modul în care are loc mobilizarea acestei energii şi cum are loc sinteza acizilor graşi. Mai departe vor fi prezentate căile de eliberare a acizilor graşi, respectiv incorporarea lor în trigliceride. Un alt aspect al metabolismului triacilglicerolilor, compuşi insolubili în apă, este acela privind transportul lor între diverse compartimente ale organismului. Există două mari fluxuri plasmatice de trigliceride:

a) circulaţia trigliceridelor alimentare, exogene, de la intestin în restul organismului;
b) circulaţia trigliceridelor de origine endogenă de la ficat spre ţesuturi extrahepatice.

În plasmă trigliceridele sunt cuprinse în particule lipoproteice. Chilomicronii reprezintă forma de transport a trigliceridelor exogene iar lipoproteinele cu densitate foarte mică (very low density lipoproteins, VLDL, pre-β-lipoproteine) transportă trigliceridele sintetizate în ficat.

VIII.5.1. HIDROLIZA TRIACILGLICEROLILOR

În ţesuturi, acest proces are loc în etape, până la glicerol şi acizi graşi:



Cele trei etape sunt catalizate de enzime distincte, triacilglicerol lipază, diacilglicerol lipază şi monoacilglicerol lipază. Prima etapă este cea mai înceată, de aceea în ţesuturi nu se acumulează di- şi monoacilglicerolii.

Hidroliza triacilglicerolilor furnizează ţesuturilor acizii graşi utilizaţi drept combustibil sau pentru alte nevoi specifice. Hidroliza triacilglicerolilor în ţesutul adipos este un proces metabolic fundamental, cu ecouri în întreg organismul, acest proces mobilizează rezervele calorice majore ale organismului (lipoliză sau adipoliză). Enzima cheie a lipolizei este triacilglicerol lipaza adipocitară, cunoscută ca „lipaza hormon sensibilă".

Produşii lipolizei sunt acizii graşi şi glicerolul. Ţesutul adipos este practic lipsit de glicerol kinază şi nu este capabil să utilizeze glicerolul. Acesta difuzează din ţesutul adipos în plasmă de unde este preluat de ficat. Concentraţia plasmatică a glicerolului este o măsură a intensităţii lipolizei.

Acizii graşi rezultaţi prin hidroliza triacilglicerolilor pot fi utilizaţi pe mai multe căi:

a) O fracţiune este degradată oxidativ pentru a obţine ATP necesar funcţiilor adipocitului.

b) Acizii graşi, după activare la acil-CoA, pot fi incorporaţi în triacilgliceroli şi depozitaţi în adipocite. Acest proces este dependent de prezenţa glucozei în adipocite (şi de insulinemie), din glucoză fiind obţinut glicerol fosfatul. În condiţii de echilibru caloric viteza de hidroliză este egală cu cea de resinteză, conţinutul în triacilgliceroli nu se modifică. Glicerolul care difuzează în plasmă indică existenţa unui proces hidrolitic.

c) Acizii graşi difuzează în plasmă, constituind fracţiunea „acizi graşi liberi" (acizi graşi neesterificaţi). Ţesuturile periferice, muşchi scheletici, miocard, diafragm, rinichi, ficat captează acizi graşi din plasmă pe care îi utilizează ca substanţe energogene. Ficatul reţine circa o treime din acizii graşi plasmatici pe care îi utilizează diferenţiat după nivelul absolut al acestora şi în funcţie de starea hormonală a organismului.

Lipoliza, hidroliza triacilglicerolilor adipocitare, este reglată la nivelul „lipazei hormon sensibile". Enzima este convertibilă prin fosforilare - defosforilare. Forma fosforilată prezintă activitate catalitică ridicată. Conversia enzimei este catalizată de protein kinaza A, AMP_c dependentă şi de o protein fosfatază specifică. Factorii hormonali care cresc concentraţia AMP_c favorizează conversia enzimei în forma activă. Din contră, scăderea concentraţiei AMP_c sau activarea fosfatazei inactivează enzima.

Catecolaminele, adrenalina eliberată de modulosuprarenale sau noradrenalina eliberată prin stimulare nervoasă sunt factori majori lipolitici. Glucagonul, prin activarea adenilat ciclazei şi creşterea concentraţiei AMP_c este un factor lipolitic important.

Insulina, prostaglandina E, metilxantinele (cofeina, teofilina) sunt factori antilipolitici, ei favorizează sinteza de triacilgliceroli în ţesutul adipos (acţiune lipogenetică).

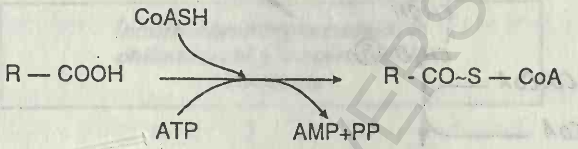
VIII.5.2. BIOSINTEZA TRIACILGLICEROLILOR

Pentru sinteza acestor compuşi, organismul dispune de două căi care diferă prin natura precursorului care cuprinde glicerolul:

a) calea monoacilglicerolului;

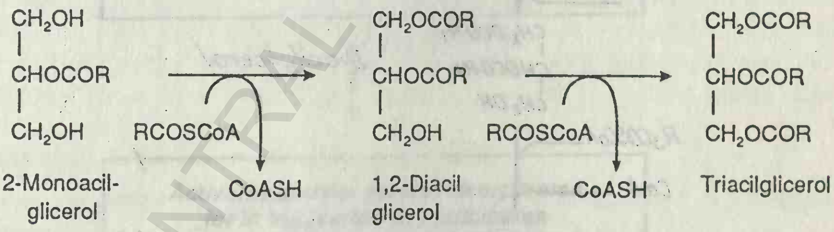
b) calea glicerol fosfatului.

Acizii graşi sunt incorporaţi în acilgliceroli ca derivaţi activi, acil-CoA:



Diverse acil transferaze catalizează transferul grupării acil pe acceptori.

Calea monoacilglicerolului funcţionează în enterocite şi reprezintă o modalitate rapidă şi economică de resinteză a triacilglicerolilor din produşii de digestie, absorbiţi din intestin:



Triacilglicerolii astfel sintetizaţi, împreună cu fosfolipide, colesterol, acil-colesterol şi proteine sunt incorporaţi în chilomicroni şi secretate mai departe în vasele limfatice.

Calea glicerol fosfatului este operaţională în majoritatea ţesuturilor (Fig. VIII.14).

În această cale biosintetică se formează ca intermediari acizii fosfatidici. De la aceşti compuşi sunt obţinute şi glicerofosfolipidele.

Sinteza de triacilgliceroli are loc în toate ţesuturile. Totuşi formarea acestor compuşi în ficat şi în ţesutul adipos joacă un rol important în economia energetică a organismului.

Sinteza triacilglicerolilor în ţesutul adipos (lipogeneza) reprezintă modalitatea de stocare a excesului caloric, lipidic sau glucidic, al organismului. Glicerol fosfatul este obţinut aproape în exclusivitate din glucoză, din intermediarul glicolitic, dihidroxiacetonofosfat. Acest fapt face lipogeneza dependentă de glicemie şi insulinemie. Acizii graşi incorporaţi în triacilglicerolii din adipocite provin din mai multe surse:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

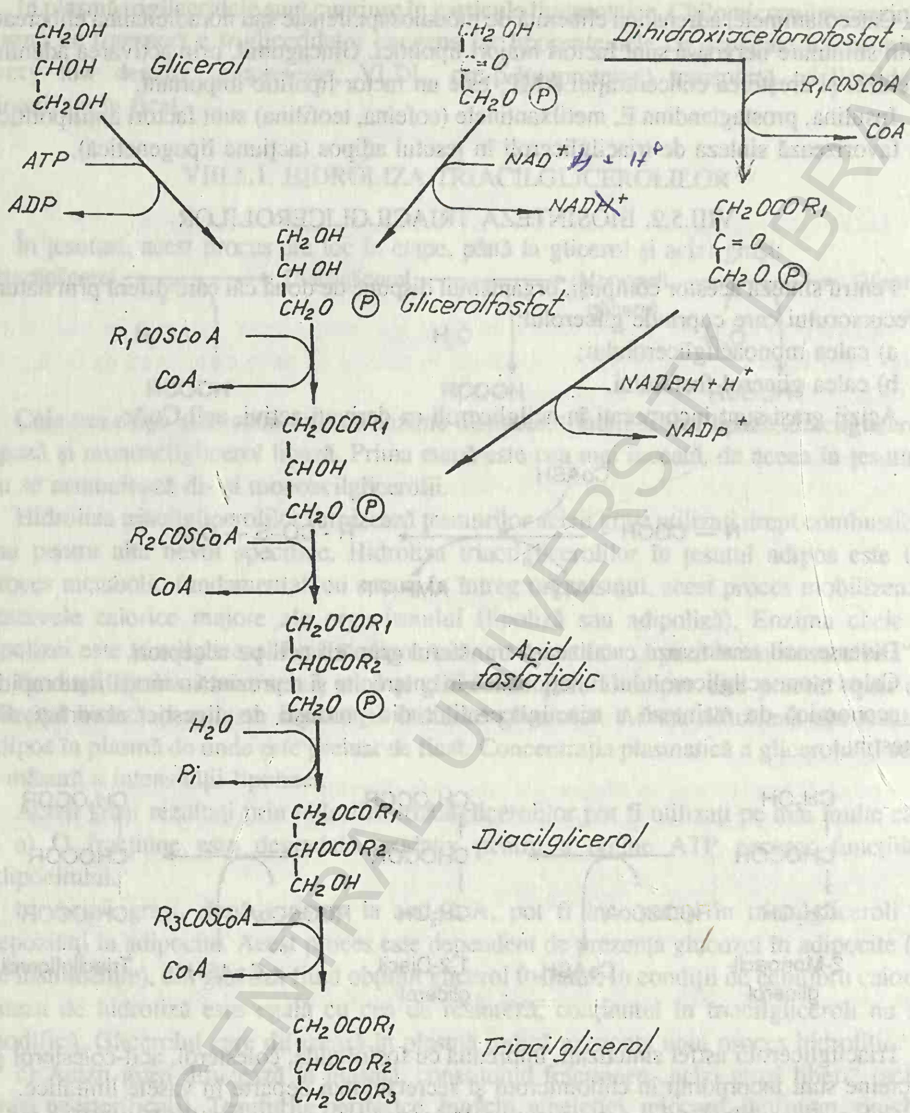


Fig. VIII. 14 - Biosinteza triaciglicerolilor (calea glicerol fosfatului)

a) Hidroliza triacilglicerolilor (lipoliza) furnizează acizi graşi care sunt reincorporaţi în aceste molecule. Triacilglicerolii se află într-o stare dinamică, cantitatea lor este staţionară, dacă sinteza şi hidroliza sunt echilibrate.

b) Sinteza de novo (din glucoză) a acizilor graşi este o sursă potenţială. Totuşi la om conversia glucozei în acizi graşi la nivelul tesutului adipos este foarte redusă, practic neglijabilă.

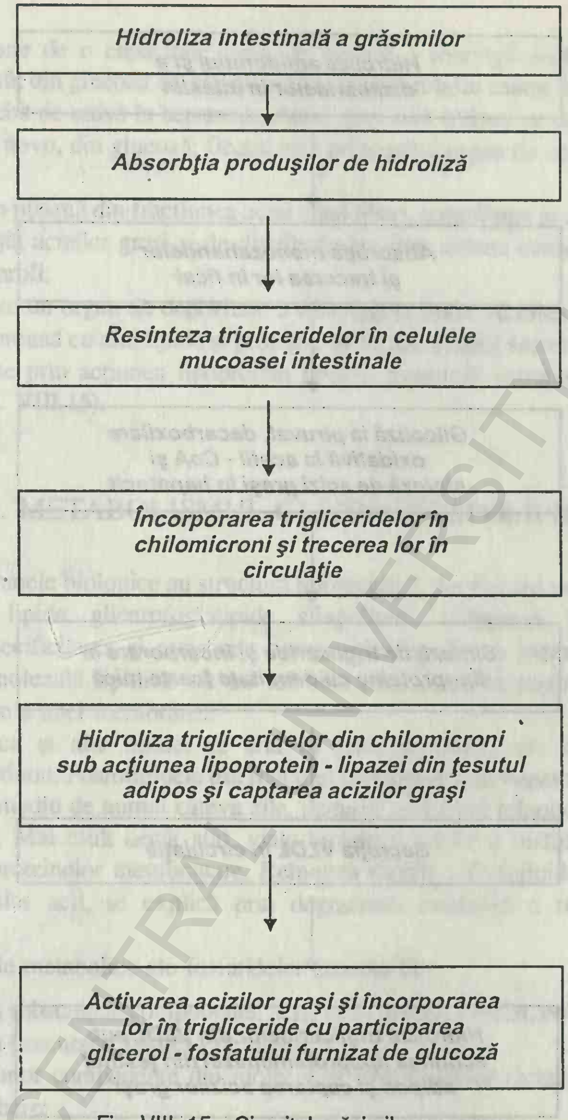


Fig. VIII. 15 - Circuitul grăsimilor exogene

c) Sursa majoră care determină o creştere netă a conţinutului de acizi graşi în ţesutul adipos sunt triacilglicerolii prezenţi în plasmă sub formă de chilomicroni (care transportă triacilglicerolii de origine alimentară) şi de VLDL (lipoproteine cu densitate foarte mică). Acestea din urmă sunt sintetizate în ficat, ele transportă triacilglicerolii de origine endogenă. Triacilglicerolii prezenţi în chilomicroni şi VLDL sunt hidrolizaţi de lipoproteinlipază şi acizii graşi obţinuţi sunt captaţi de adipocite şi apoi incorporaţi în triacilgliceroli. În Fig. VIII.15 şi VIII.16 sunt arătate etapele prin care excesul de grăsimi alimentare şi/sau de glucide este depozitat în ţesutul adipos.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

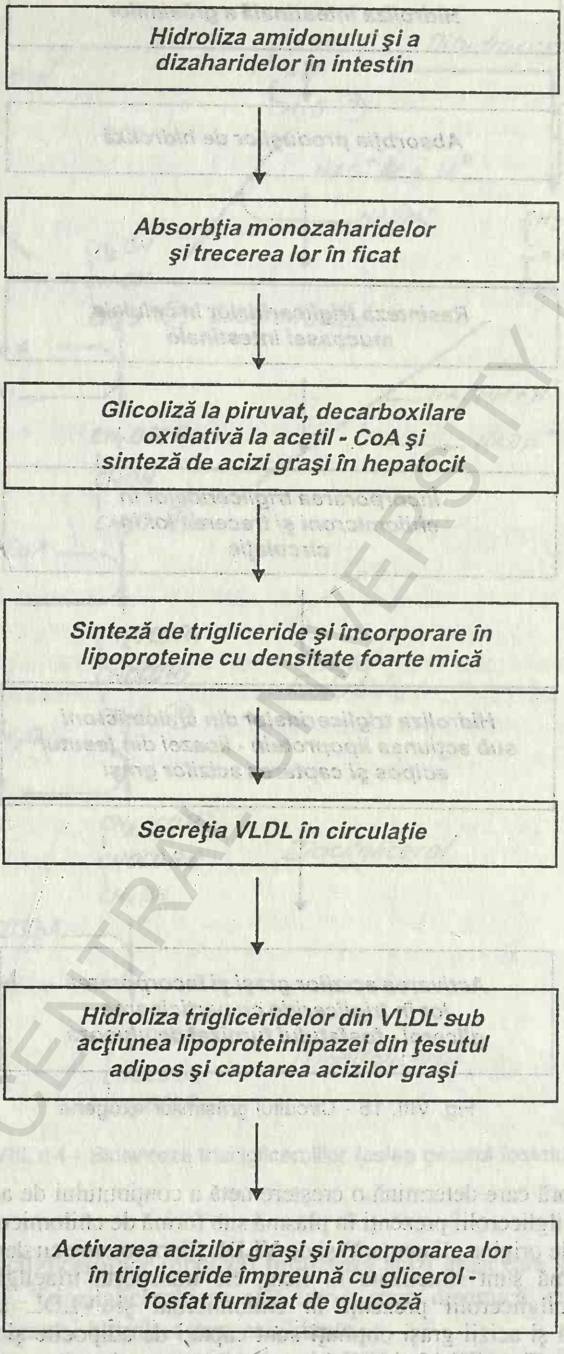


Fig. VIII. 16 - Circuitul glucidelor exogene până la constituirea depozitului de grăsimi adipocitare

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ficatul dispune de o capacitate mare de sinteză a triacilglicerolilor. Poate obţine glicerol fosfat atât din glucoză cât şi prin activarea glicerolului captat din plasmă. Glicerol kinaza este deosebit de activă în hepatocite. Acizii graşi sunt obţinuţi pe două căi:

a) sinteză de novo, din glucoză; ficatul este principalul organ de conversie a glucozei în lipide;

b) captare din plasmă din fracţiunea acizi graşi liberi, contribuţia acestei surse depinde de concentraţia acizilor graşi şi de distribuţia lor spre ardere, cetogeneză sau sinteză de triacilgliceroli.

Ficatul nu este un organ de depozitare a triacilglicerolilor. Acestea după sinteză sunt incorporate, împreună cu alte lipide şi proteine, în VLDL şi apoi secretate în plasmă. Din VLDL circulante prin acţiunea lipoprotein lipazei, ţesuturile extrahepatice îşi procură acizi graşi. (Fig. VIII.15).

VIII.6. METABOLISMUL GLICEROFOSFOLIPIDELOR

Toate membranele biologice au structură lipoproteică, dar fiecare membrană cuprinde un mozaic de lipide, glicerofosfolipide, sfingolipide, colesterol, în raporturi bine determinate. Specificitatea şi constanţa compoziţiei lipidice a membranelor arată că fiecare tip de moleculă lipidică are un rol bine determinat în asigurarea structurii şi funcţiei specifice a unei membrane.

Fosfatidele, ca şi alte lipide, se află în stare dinamică, ele sunt degradate şi resintetizate continuu. Fosfolipidele din reticulul endoplasmic al hepatocitului au un timp de înjumătăţire mediu de numai câteva zile, resturile acil fiind reînoite mult mai repede decât glicerolul. Mai mult decât atât, viaţa biologică medie a fosfolipidelor este mai scurtă decât a proteinelor membranare. Reînoirea rapidă a fosfolipidelor, în particular reînoirea resturilor acil, se explică prin degradarea oxidativă a resturilor de acizi nesaturaţi.

Transformările metabolice ale fosfatidelor constau în:

a) hidroliza la substanţele componente, acizi graşi, glicerol fosfat, colină sau alt alcool;

b) sinteză din precursori (sinteză de novo);

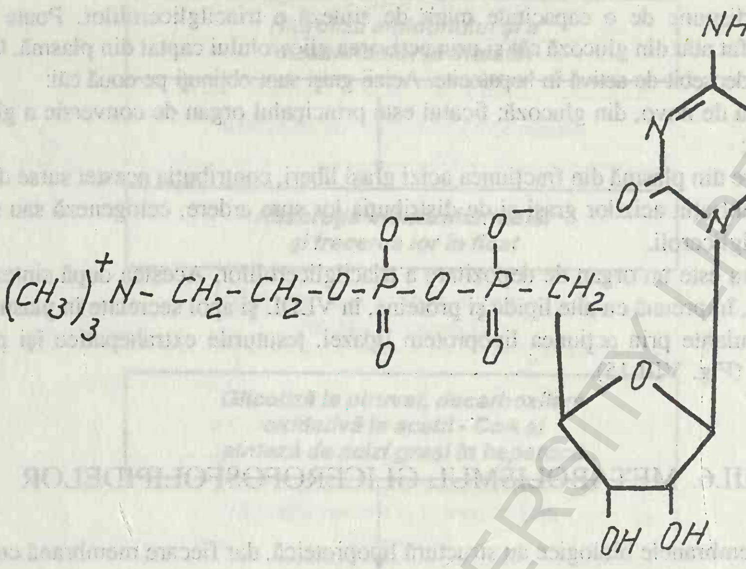
c) schimbul unor componente din moleculele fosfolipidelor (acizi graşi, alcooli) cu substanţele libere;

d) interconversiunea fosfatidelor prin modificarea resturilor de alcool (de exemplu serină → etanolamină, etanolamină → colină).

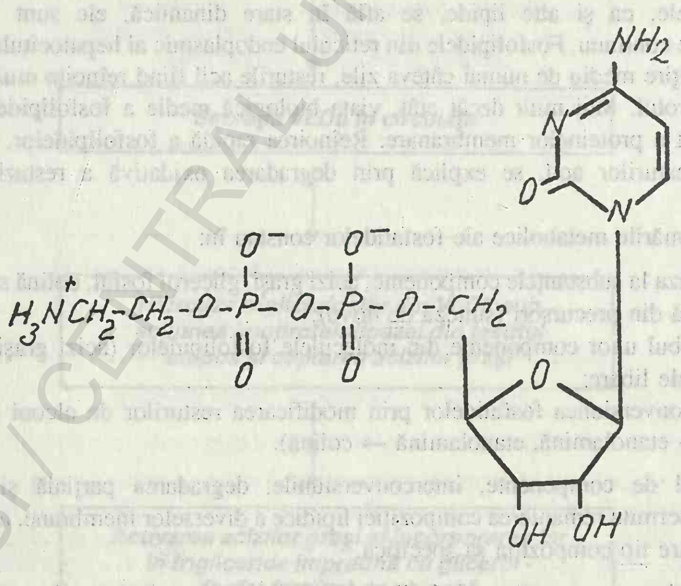
Schimbul de componente, interconversiunile, degradarea parţială şi reutilizarea produşilor permite remanierea compoziţiei lipidice a diverselor membrane, asigurându-se pentru fiecare tip compoziţia sa specifică.

Sinteza de novo a glicerofosfolipidelor utilizează ca intermediar comun acidul fosfatidic, obţinut aşa cum s-a arătat la biosinteza trigliceridelor. O particularitate a biosintezei fosfatidelor este participarea unor precursori în forme active de derivaţi ai citidin difosfatului (CDP) ca CDP-colină, CDP-etanolamină, CDP-diglicerid:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

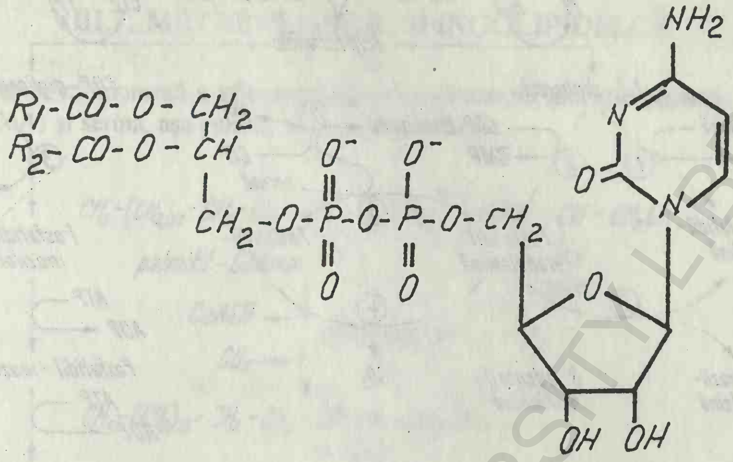


CDP — colină



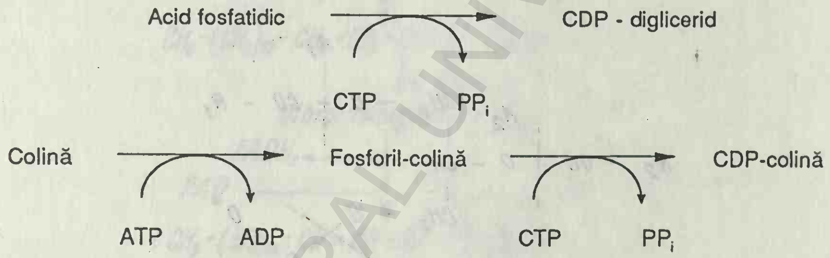
CDP - etanolamină

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



CDP — diglicerid

Reacţiile de formare a acestor derivaţi sunt:



CDP - etanolamina este obţinută prin reacţii similare.

În Fig. VIII.17 sunt arătate căile de obţinere a principalelor categorii de glicerofosfolipide. De subliniat posibilitatea interconversiunii fosfatidil-etanolamină → fosfatidil-serină prin schimbul dintre serină liberă şi fosfatidil-etanolamină (reacţia 6), ca şi trecerea fosfatidil-serină → fosfatidil-etanolamină prin decarboxilare (reacţia 4); prin metilare restul de etanolamină este transformat în rest de colină (reacţia 5). Donorul de grupări metil este S - adenozil-metionina (metionina activă).

Degradarea fosfatidelor. Asupra glicerofosfolipidelor acţionează diverse fosfolipaze A_1, A_2, B (lizofosfolipază), C (Fig. VIII.18). O fosfolipază D care detaşează alcoolul este cunoscută numai la plante.

Prin acţiunea secvenţială a acestor enzime fosfatidele sunt hidrolizate la acizi graşi, glicerol şi fosforil-colină.

Aceste enzime acţionează şi independent una de cealaltă, produşii de reacţie servind la reconstituirea altor molecule. Prin astfel de reacţii are loc redistribuirea componentelor în diverse fosfolipide, remanierea lor în raport cu factori nutriţionali, metabolici sau de mediu.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

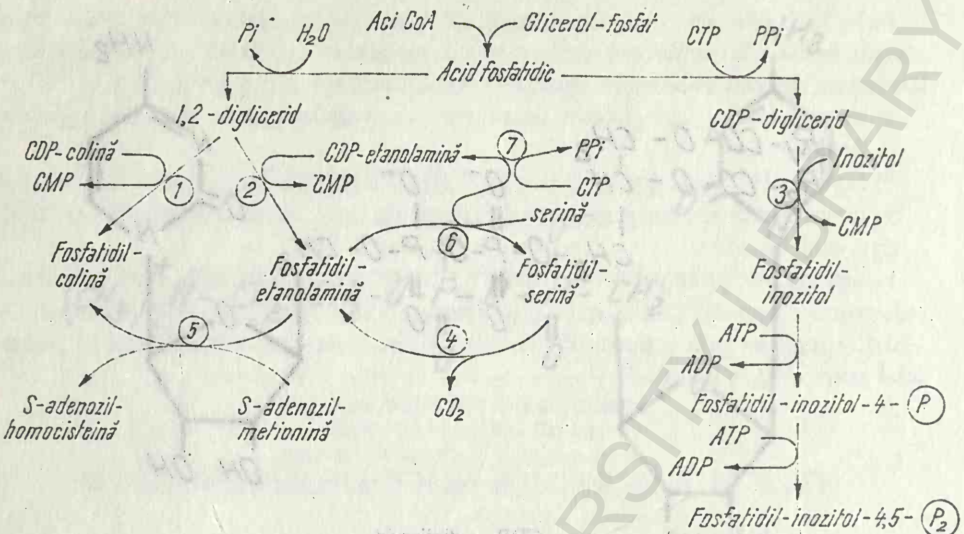


Fig. VIII. 17 - Metabolismul fosfatidelor

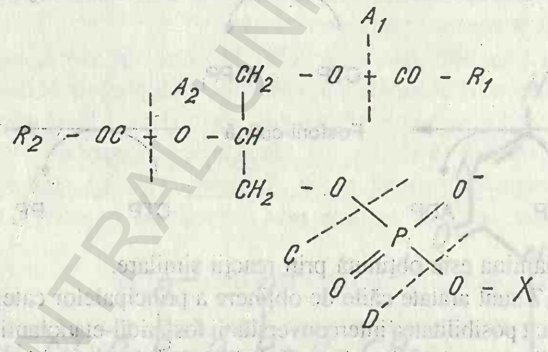


Fig. VIII. 18 - Punctele de scindare a unui glicerofosfolipid sub acţiunea fosfolipazelor (A_1, A_2, C,D)

Activarea unor fosfolipaze membranare prin acţiunea unor stimuli externi şi iniţierea de răspunsuri intracelulare constituie o modalitate de transmitere de semnale intracelulare. Activarea fosfolipazei A_2 eliberează din fosfolipide acid arahidonic materie primă pentru biosinteza de prostaglandine şi leucotriene. Alţi compuşi biologic activi (hormoni, neurotransmiţători, factori de creştere) activează fosfolipaza C care acţionând asupra inozitol-fosfolipidelor membranare eliberează diacil-glicerol (1,2-diglicerid) şi inozitol-fosfat (mono-, bis- sau trisfosfat), mesageri intracelulari ai semnalelor extracelulare (vezi capitolul privind hormonii).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VIII.7. METABOLISMUL SFINGOLIPIDELOR

Sfingozina, componentă a sfingolipidelor este sintetizată din acid palmitic (de fapt palmitil-CoA) şi serină, aşa cum se arată în Fig. VIII.19.

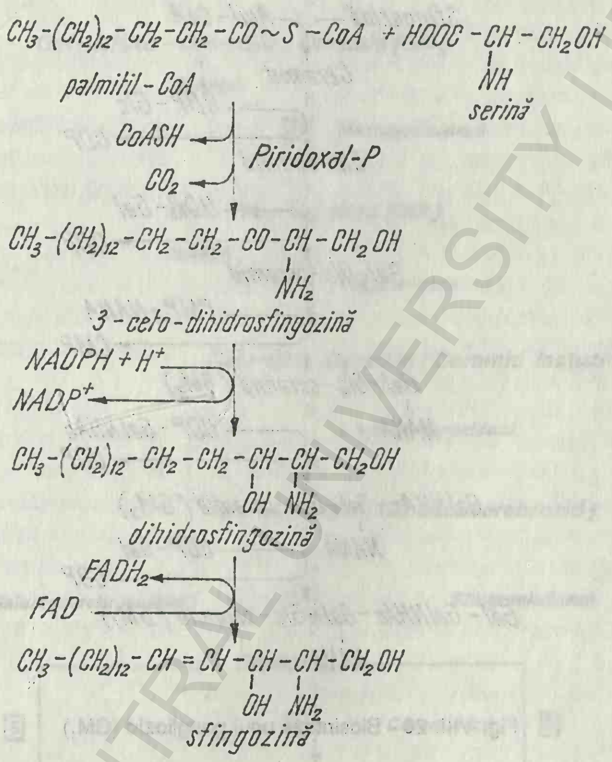


Fig. VIII. 19 - Biosinteza sfingozinei

De la sfingozină se obţine ceramidul prin reacţia:

sfingozină + acil - S ~ CoA ——(CoASH)——> acil-sfingozină (ceramid)

Sfingomielinele sunt obţinute de la ceramide prin reacţia:

ceramid + CDP - colină ——(CDP)——> sfingomielină.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La sinteza sfingoglicolipidelor participă derivaţii UDP-galactoză, UDP-glucoză, UDP-N-acetil-galactozamină care furnizează resturile glicozil active. Pentru acidul N-acetil-neuraminic (NANA, acid sialic) forma activată este aceea de CMP-N-acetil-neuraminat.

În Fig. VIII.20 se arată succesiunea de reacţii pentru sinteza gangliozidului GM_1.

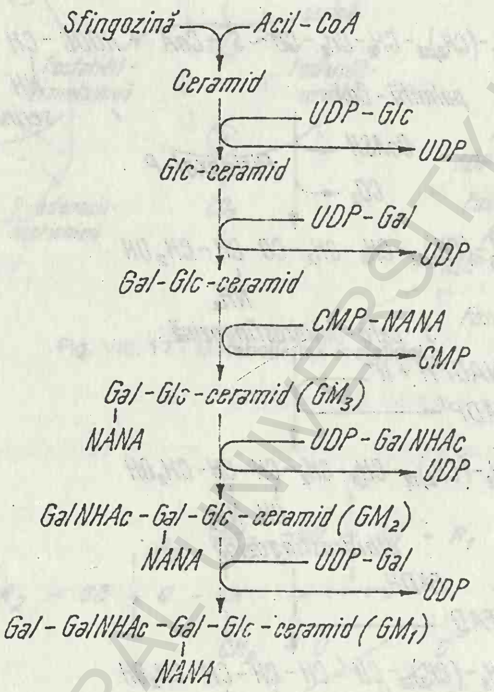


Fig. VIII. 20 - Biosinteza unui gangliozid (GM_1)

Degradarea sfingolipidelor are loc sub acţiunea secvenţială a numeroase hidrolaze cu specificitate pentru fiecare tip de legătură din moleculele lor. La sfingomieline atacul începe prin acţiunea unei fosfoesteraze (sfingomielinază) care detaşează fosforil-colina; asupra ceramidului acţionează o ceramidază (carboxiamidază). În cerebrozide şi gangliozide hidroliza are loc prin detaşarea resturilor glicozil începând de la capătul nereducător. Fiecare tip de legătură glicozidică este scindată de o glicozidază specifică. Ample cunoştinţe despre aceste enzime hidrolitice, multe dintre ele localizate în lizozomi, au fost obţinute prin studiul unor boli ereditare caracterizate prin acumulare de sfingolipide în viscere, în creier (lipidoze sau sfingolipidoze). Deficienţa sau absenţa unei hidrolaze blochează secvenţa de degradare şi produsul situat în amonte faţă de enzima deficitară se acumulează. În Fig. VIII.21 sunt arătate căile de degradare a sfingolipidelor şi principalele deficienţe enzimatice care provoacă lipidoza.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

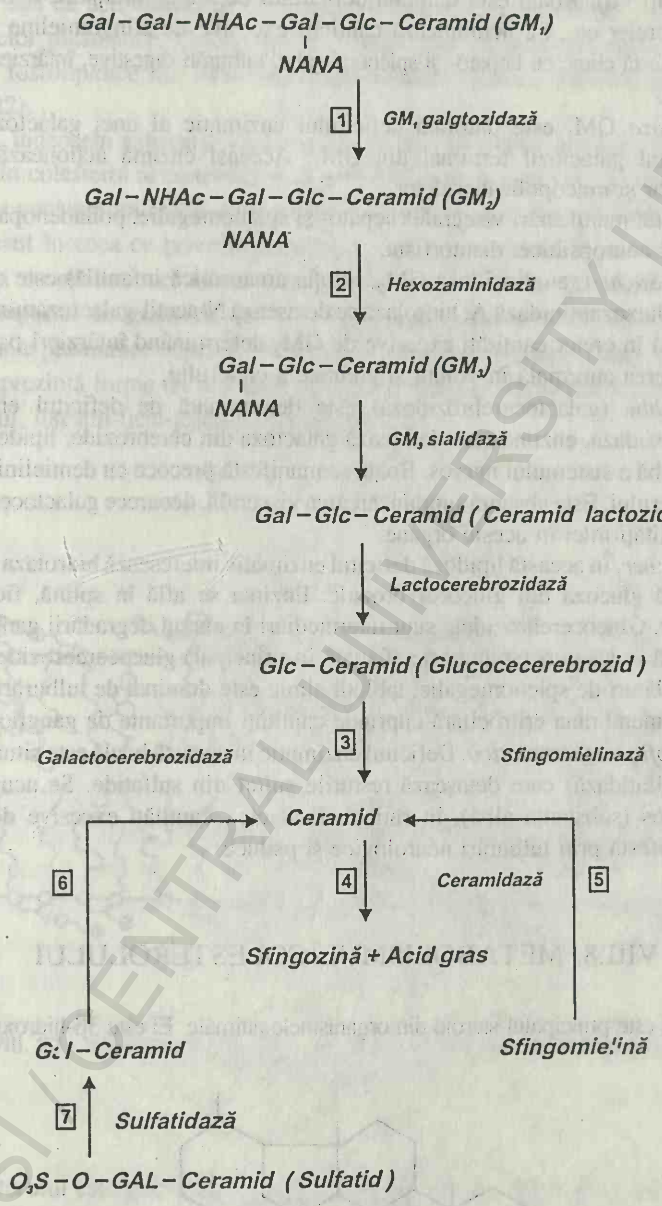


Fig. VIII. 21 - Degradarea sfingolipidelor
Gal = galactoză; Gal-NHAc = N-acetil-galactozamină; Glc = glucoză;
NANA = acid N-acetil-neuraminic
Boala asociată cu deficitul enzimatic: 1 = Gangliozidoză; 2 = Boala Tay-Sachs; 3 = Boala Gaucher; 4 = Boala Farber; 5 = Boala Niemann-Pick; 6 =Boala Krabbe; 7 = Leucodistrofie metacromatică

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Boala Niemann-Pick este una dintre lipidozele cu cea mai mare frecvenţă (1 caz la 330.000 născuţi vii). Boala este datorată deficitului de sfingomielinază lizozomală din ficat, splină, creier etc. Se acumulează cantităţi excesive de sfingomieline în ţesuturi. Boala se manifestă clinic cu hepato- şi splenomegalie, tulburări digestive, întârziere psihomotorie, convulsii.

Gangliozidoza GM_1 este datorată deficitului enzimatic al unei galactozidaze care detaşează restul galactozil terminal din GM_1. Aceeaşi enzimă acţionează şi asupra glicoproteinelor şi mucopolizaharidelor.

Boala are atât manifestări viscerale (hepato- şi splenomegalie, poliadenopatie), alături de manifestări neuropsihice, dismorfism.

Boala Tay-Sachs (gangliozidoza GM_2, idioţia amaurotică infantilă) este determinată de deficitul în hexozaminidază A, hidrolază ce detaşează N-acetil-galactozamina din GM_2. Se acumulează în creier cantităţi excesive de GM_2 determinând întârzieri psihomotorii, cecitate, creşterea anormală în volum şi greutate a creierului.

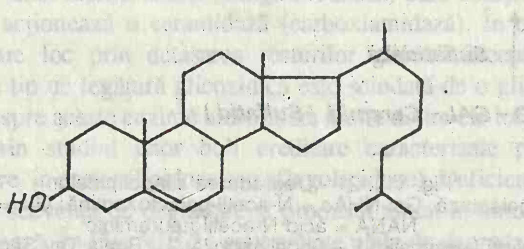
Boala Krabbe (galactocerebrozidoza) este determinată de deficitul enzimatic în galactocerebrozidază, enzimă care detaşează galactoza din cerebrozide, lipide abundente în substanţa albă a sistemului nervos. Boala se manifestă precoce cu demielinizări întinse la nivelul creierului. Este absentă supraîncărcarea viscerală, deoarece galactocerebrozidele se află în cantităţi mici în aceste organe.

Boala Gaucher. În această lipidoză deficitul enzimatic interesează hidrolaza lizozomală care detaşează glucoza din glucocerebrozide. Enzima se află în splină, ficat, rinichi, intestin, creier. Glucocerebrozidele sunt intermediari în cursul degradării gangliozidelor. Se acumulează în ţesuturi (splina este afectată în principal) glucocerebrozide, alături de GM_1, GM_2. Alături de splenomegalie, tabloul clinic este dominat de tulburări hematologice, întrucât membrana eritrocitară cuprinde cantităţi importante de gangliozide.

Leucodistrofia metacromatică. Deficitul enzimatic în această boală este situat la nivelul hidrolazei (sulfatidază) care detaşează resturile sulfat din sulfatide. Se acumulează în sistemul nervos (substanţa albă), în rinichi, ficat etc., cantităţi excesive de sulfatide. Boala se manifestă prin tulburări neurologice şi psihice.

VIII.8. METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Colesterolul este principalul steroid din organismele animale. El este 3β-hidroxi-5-colesten:



Colesterolul îndeplineşte numeroase funcţii:

a) Liber sau ca acil-colesterol este element structural al membranelor celulare şi al lipoproteinelor plasmatice. Catena alifatică şi nucleul rigid al steranului inseraţi între moleculele fosfolipidice din straturile dublu lipidice reglează fluiditatea membranelor (Fig. VIII.22).

Creierul, îndeosebi substanţa albă, cuprinde cantităţi relativ mari de colesterol liber. Conţinutul în colesterol al creierului şi al nervilor creşte în perioada de mielinizare după care rămâne constant tot restul vieţii. Acest colesterol este stabil metabolic. Ficatul este al doilea ţesut în ceea ce priveşte conţinutul total în colesterol, în mare parte ca acil-colesterol şi cu un turnover foarte rapid. Cortexul adrenalelor, gonadele cuprind mult colesterol raportat la gram de ţesut, aceste glande sintetizează hormoni steroidici. Lipoproteinele plasmatice cuprind colesterol în proporţii variabile (Tabel VIII.4). Aceste particule reprezintă forme de transport al colesterolului între diverse compartimente ale organismului, intestin-ficat-ţesuturi extrahepatice.

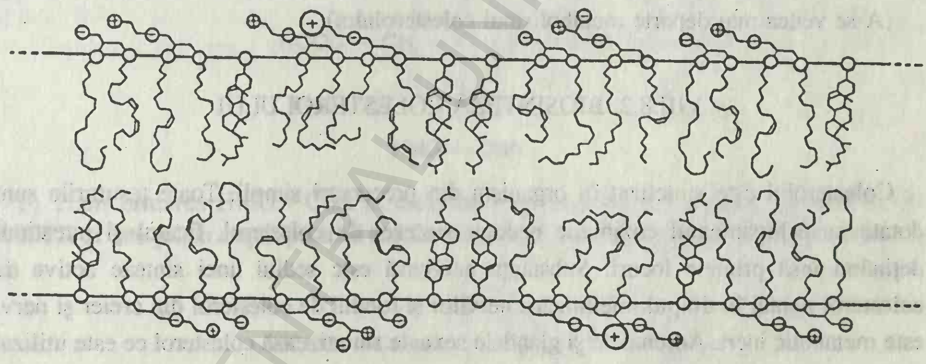


Fig. VIII. 22 - Intercalarea colesterolului printe moleculele de fosfolipide reglează fluiditatea membranelor

b) Colesterolul este precursorul hormonilor steroidici-corticosuprarenalieni, sexuali.

c) Colesterolul este precursor al acizilor biliari.

d) Colesterolul (sau un precursor al său) este materia primă pentru sinteza calciferolului (vitamina D_3).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VIII.8.1. DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA COLESTEROLULUI

Colesterolul din organism provine atât din alimente (aproximativ 0,5 g) cât şi prin sinteză endogenă (1 g). Colesterolul este cuprins numai în alimente de origine animală, cele mai bogate surse sunt ouăle, ficatul, creierul. În intestin, colesterolul exogen se adaugă colesterolului din bilă şi aceluia din celulele mucosale descuamate.

Prin acţiunea solubilizantă a bilei, colesterolul este incorporat în micelii şi esterii sunt hidrolizaţi sub acţiunea colesterol esterazei pancreatice. În final, împreună cu ceilalţi produşi ai digestiei lipidice, colesterolul este absorbit din faza micelară, pătrunzând în enterocite. Capacitatea mucoasei intestinale de a absorbi colesterol este limitată şi numai o fracţiune din colesterolul exogen este absorbit (aproximativ 300 mg).

În celulele mucosale o parte din colesterol este esterificat şi împreună cu alţi componenţi este incorporat în chilomicroni, lipoproteine ce sunt secretate în vasele limfatice care drenează intestinul şi via canalul toracic ajung în circulaţia sanguină. (A se vedea mai departe metabolismul colesterolului).

VIII.8.2. BIOSINTEZA COLESTEROLULUI

Colesterolul este sintetizat în organism din precursori simpli. Toate ţesuturile sunt dotate cu echipamentul enzimatic necesar sintezei de colesterol, ficatul şi intestinul deţinând însă primele locuri. Substanţa nervoasă este sediul unei sinteze active de colesterol numai în timpul mielinizării nervilor şi fondul de colesterol din creier şi nervi este metabolic inert. Adrenalele şi glandele sexuale sintetizează colesterol ce este utilizat mai departe pentru sinteza de hormoni, acest fond nu participă la circuitul metabolic al colesterolului. Ficatul este furnizorul principal de colesterol pentru ţesuturile extrahepatice şi totodată, este locul de tranzit al colesterolului în vederea excreţiei. În mucoasa intestinală are loc o biosinteză activă de colesterol, şi acela pierdut prin descuamarea epiteliului intestinal este în partea reabsorbit.

Materia primă pentru sinteza colesterolului este acetil-CoA care poate fi obţinută din glucoză (glicoliză la piruvat şi decarboxilare oxidativă), acizi graşi (prin β-oxidare) şi din catenele unor aminoacizi (după transaminare şi degradarea catenei ternare). Cantităţile cele mai mari de acetil-CoA sunt furnizate de acizii graşi.

Colesterolul şi ceilalţi compuşi steroidici aparţin grupului de compuşi poliizoprenici. El se formează prin condensarea a şase unităţi de izopren activ. Biosinteza colesterolului poate fi împărţită în mai multe etape:

a) formarea hidroxil-metil-glutaril-CoA (HMG - CoA) din acetil-CoA;

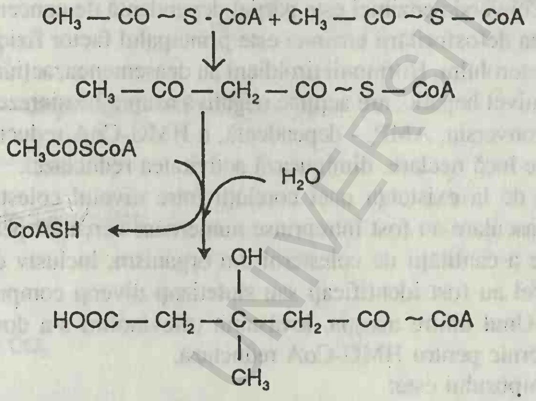
b) transformarea HMG - CoA în „izopren biologic activ";

c) condensarea a şase unităţi izoprenice cu formarea unei hidrocarburi C_{30}, scualen;

d) ciclizarea scualenului şi formarea primului compus steroidic, lanosterol;

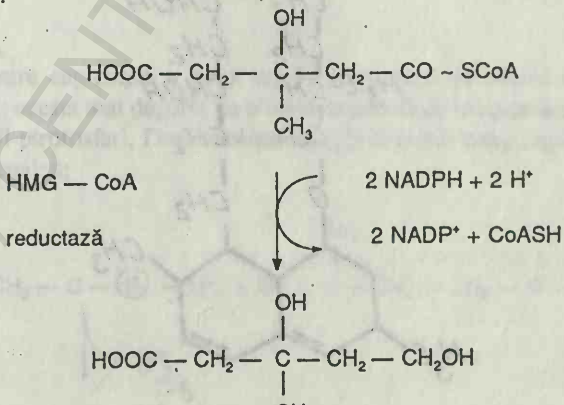
e) transformarea lanosterolului în colesterol.

a) Hidroxi-metil-glutaril-CoA este metabolit intermediar şi al cetogenezei. Există două fonduri metabolice de HMG - CoA, unul mitocondrial care duce la corpi cetonici şi altul citosolic din care se obţin steroizi. Sinteza HMG - CoA are loc prin reacţiile:



HMG — CoA

b) Transformarea HMG - CoA în mevalonat este un proces reductiv, dependent de NADPH şi este prima etapă specifică colesterologenezei, este etapa reglatorie a procesului:



acid mevalonic

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

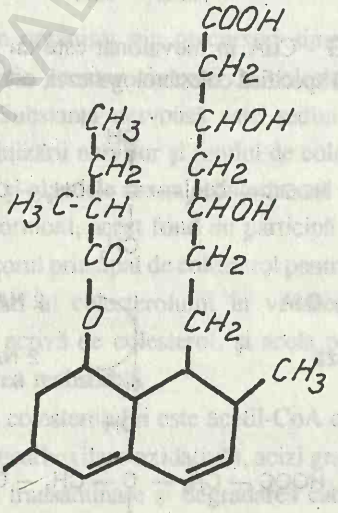
Reacţia este catalizată de HMG-CoA reductază, enzimă localizată la nivelul reticulului endoplasmic. Este alcătuită dintr-un lanţ polipeptidic (887 aminoacizi) cu două domenii structurale, unul hidrofob, membranar şi altul care proeminează în citosol. Activitatea catalitică este localizată pe acesta din urmă.

Activitatea enzimei este reglată prin mai multe mecanisme. Cantitatea de proteină enzimatică este controlată atât la nivelul sintezei, a transcrierii genei, cât şi prin modificări ale vitezei de degradare a enzimei. Timpul de înjumătăţire pentru HMG-CoA reductază de 2-4 ore este mult mai scurt decât pentru alte enzime. Colesterolul celular este probabil factorul reglator principal, el acţionează ca represor al sintezei enzimei, pe de o parte şi accelerează degradarea enzimei, pe de alta.

Un alt mecanism reglator pentru HMG-CoA reductază are la bază conversia enzimei prin fosforilare - defosforilare. Activitate catalitică mai ridicată manifestând forma defosforilată. Conversia enzimei este parţial dependentă de concentraţia AMP_c. Insulina, prin promovarea defosforilării enzimei este principalul factor fiziologic care controlează biosinteza colesterolului. Hormonii tiroidieni au deasemenea, acţiune colesterologenetică. Glucagonul la nivel hepatic, are acţiune negativă asupra biosintezei colesterolului, foarte probabil prin conversia, AMP_c - dependentă, a HMG-CoA reductazei. Glucocorticoizii, prin mecanisme încă neclare, diminuează activitatea reductazei.

Pornindu-se de la existenţa unei corelaţii între nivelul colesterolemiei şi incidenţa bolilor cardiovasculare au fost întreprinse numeroase cercetări pentru a găsi mijloace şi căi de reducere a cantităţii de colesterol din organism, inclusiv diminuarea biosintezei endogene. Astfel au fost identificaţi sau sintetizaţi diverşi compuşi care inhibă sinteza colesterolului. Unul dintre aceştia, lovastatin (mevinolin) s-a dovedit a fi un inhibitor competitiv puternic pentru HMG-CoA reductaza.

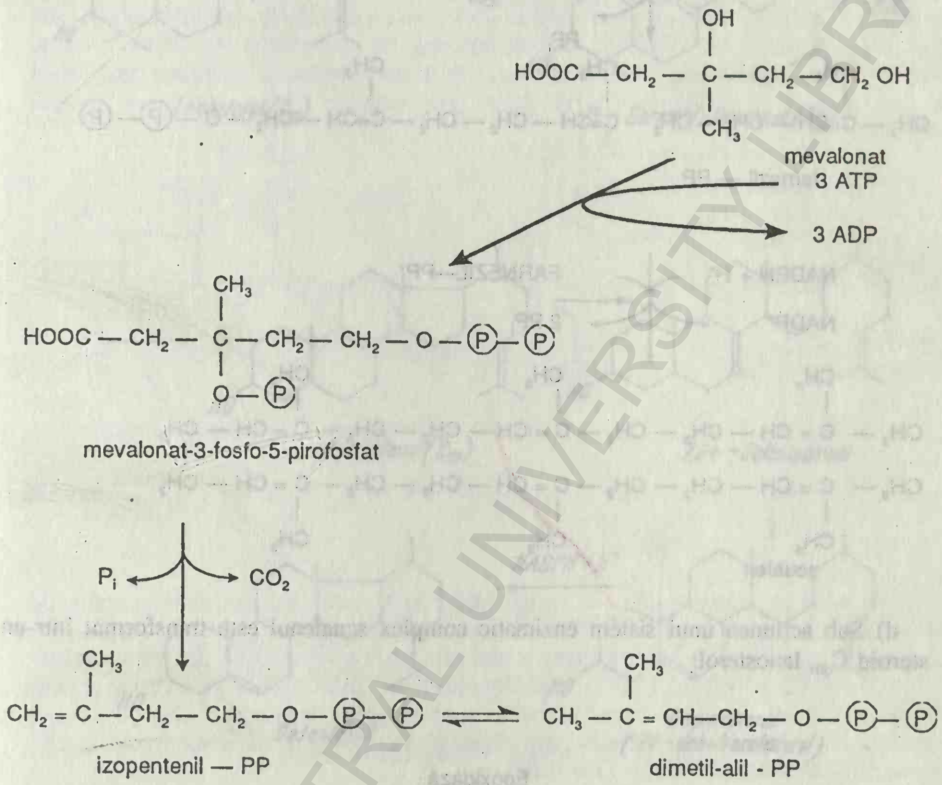
Formula compusului este:



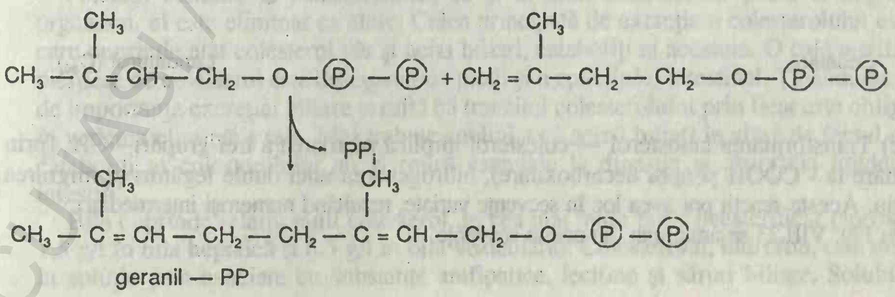
Lovastatinul este lipsit de toxicitate şi a fost introdus în tratamentul hipercolesterolemiilor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

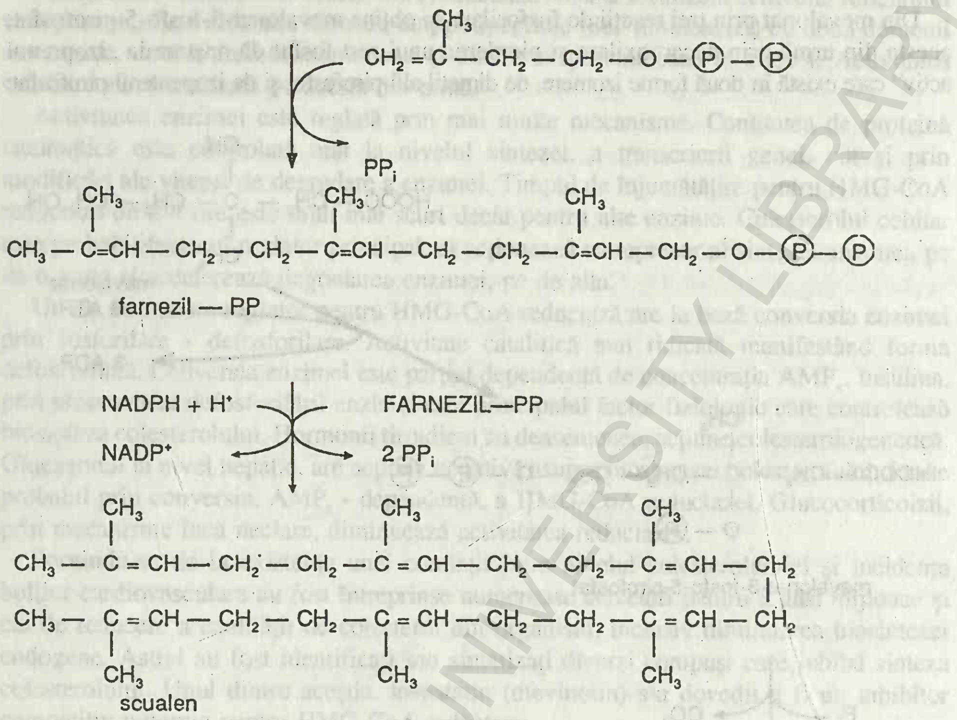
Din mevalonat prin trei reacţii de fosforilare se obţine mevalonat-3-fosfo-5-pirofosfat; acesta din urmă prin decarboxilare şi pierderea unui rest fosfat dă naştere la „izoprenul activ" care există în două forme izomere, de dimetil-alil-pirofosfat şi de izopentenil-pirofosfat:



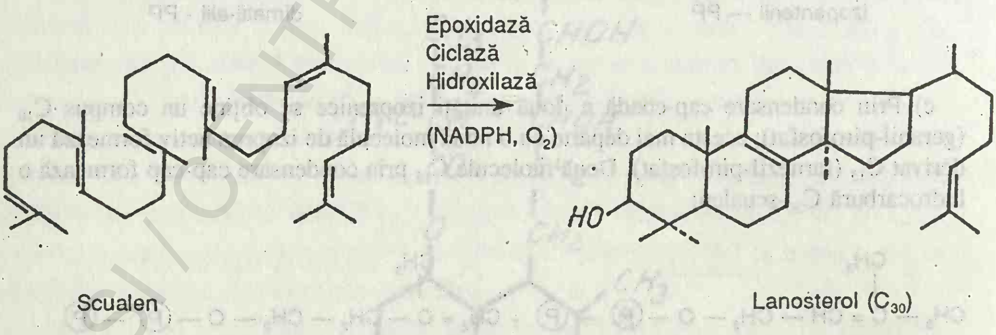
c) Prin condensare cap-coadă a două unităţi izoprenice se obţine un compus C_{10} (geranil-pirofosfat); acesta mai departe cu o nouă moleculă de izopren activ formează un derivat C_{15} (farnezil-pirofosfat). Două molecule C_{15} prin condensare cap-cap formează o hidrocarbură C_{30}-scualen:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



d) Sub acţiunea unui sistem enzimatic complex scualenul este transformat într-un steroid C_{30}, lanosterol:



e) Transformarea lanosterol → colesterol implică pierderea a trei grupări - CH_3 (prin oxidare la - COOH şi apoi decarboxilare), hidrogenarea unei duble legături şi migrarea alteia. Aceste reacţii pot avea loc în secvenţe variate, rezultând numeroşi intermediari.

În Fig. VIII.23 se arată una din aceste secvenţe.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

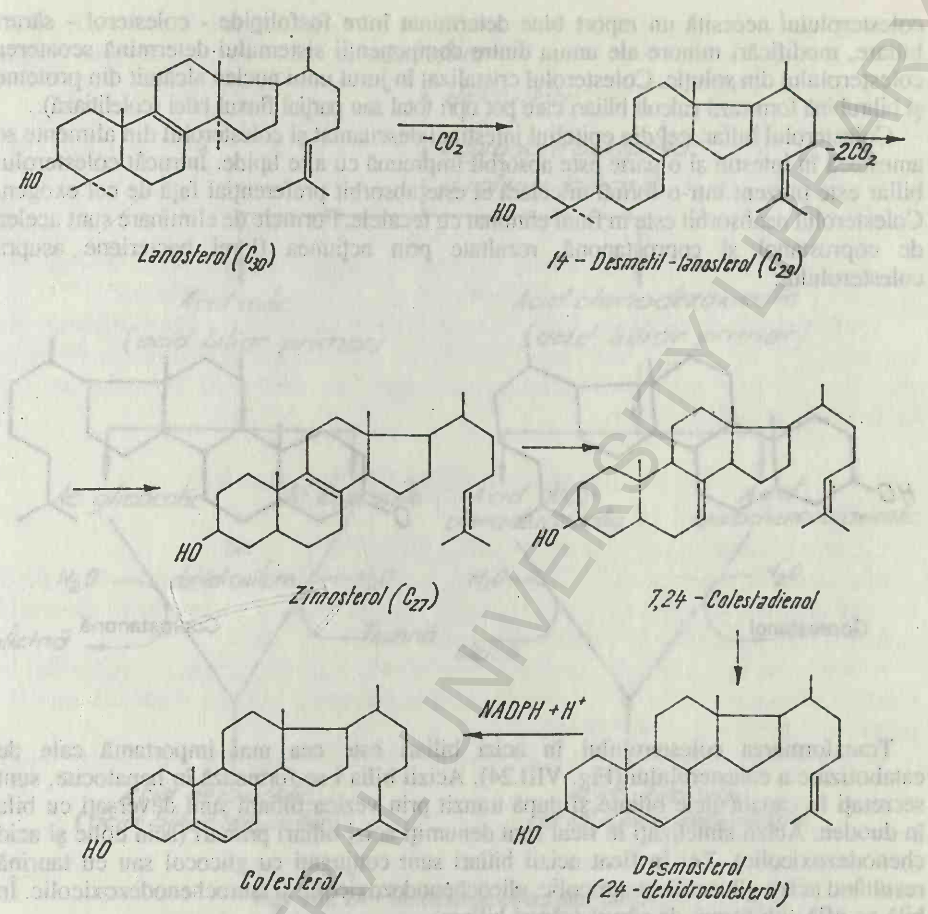


Fig. VIII. 23 - Transformarea lanosterol→colesterol

VIII.8.3. CATABOLISMUL COLESTEROLULUI

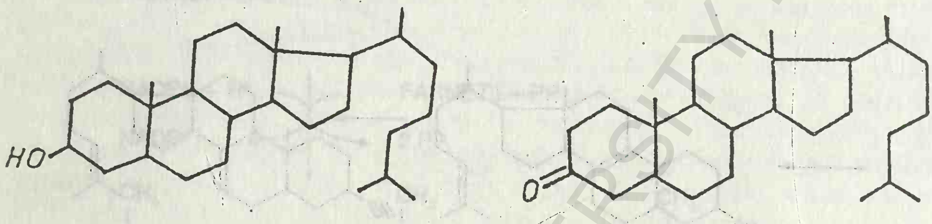
Nucleul steranic al colesterolului, ca şi al altor steroizi, nu poate fi degradat în organism, el este eliminat ca atare. Calea principală de excreţie a colesterolului este bila care cuprinde atât colesterol cât şi acizi biliari, cataboliţi ai acestuia. O cale auxiliară de pierdere de colesterol este descuamarea pielii şi a epiteliului intestinal. Ţinându-se seama de importanţa excreţiei biliare rezultă că tranzitul colesterolului prin ficat este obligatoriu în vederea eliminării sale. Mai trebuie subliniat că acizii biliari în afară de faptul că sunt cataboliţi ai colesterolului au şi roluri esenţiale la digestia şi absorbţia lipidelor din intestin.

Bila cuprinde relativ mult colesterol, în cea mai mare parte neesterificat (aproximativ 1,5 g/l în bila hepatică şi 6,5 g/l în bila veziculară). Colesterolul, hidrofob, este menţinut în soluţie prin asociere cu substanţe amfipatice, lecitine şi săruri biliare. Solubilizarea

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

colesterolului necesită un raport bine determinat între fosfolipide - colesterol - săruri biliare, modificări minore ale unuia dintre componenţii sistemului determină scoaterea colesterolului din soluţie. Colesterolul cristalizat în jurul unui nucleu alcătuit din proteine şi bilirubină formează calculi biliari care pot opri total sau parţial fluxul bilei (colelitiază).

Colesterolul biliar, cel din epiteliul intestinal descuamat şi colesterolul din alimente se amestecă în intestin şi o parte este absorbit împreună cu alte lipide. Întrucât colesterolul biliar este prezent într-o formă micelară el este absorbit preferenţial faţă de cel exogen. Colesterolul neabsorbit este în final eliminat cu fecalele. Formele de eliminare sunt acelea de coprostanol şi coprostanonă, rezultate prin acţiunea florei bacteriene asupra colesterolului:



Coprostanol

Coprostanonă

Transformarea colesterolului în acizi biliari este cea mai importantă cale de catabolizare a colesterolului (Fig. VIII.24). Acizii biliari se formează în hepatocite, sunt secretaţi în canaliculele biliare şi după tranzit prin vezica biliară sunt deversaţi cu bila în duoden. Acizii sintetizaţi în ficat sunt denumiţi acizi biliari primari (acid colic şi acid chenodezoxicolic). Tot în ficat acizii biliari sunt conjugaţi cu glicocol sau cu taurină rezultând acizii glicocolic, taurocolic, glicochenodezoxicolic şi taurochenodezoxicolic. În bilă se află sub formă de săruri (săruri biliare).

În intestin după ce au participat la solubilizarea lipidelor alimentare şi la absorbţia acestora, sunt supuşi unor transformări catalizate de enzime ale florei bacteriene intestinale: îndepărtarea grupei hidroxil din poziţia 7 şi hidroliza legăturii amidice. Se formează în acest fel acizi biliari secundari: acidul dezoxicolic (din acid colic) şi acidul litocolic (din acid chenodezoxicolic). În segmentul distal al ileonului acizii biliari sunt resorbiţi printr-un mecanism activ şi prin sistemul port ajung din nou în ficat. La nivelul ficatului acizii biliari sunt conjugaţi şi împreună cu alţi acizi biliari primari sunt secretaţi în bilă şi apoi eliminaţi în intestin realizându-se astfel circuitul enterohepatic al acizilor biliari.

La fiecare tură a circuitului enterohepatic o cantitate oarecare de acizi biliari scapă reabsorbţiei şi sunt eliminaţi cu fecalele. Această pierdere netă de acizi biliari constituie o cale de excreţie a colesterolului. Se estimează că o moleculă individuală de acid biliar parcurge de câteva ori circuitul ficat-intestin-ficat-intestin înainte de a fi eliminată. Ţinându-se seama că fondul de acizi biliari al unui adult este de 5-6 g şi că aceştia circulă de 5-6 ori rezultă că 20-30 g de acizi biliari parcurg zilnic circuitul enterohepatic. Pierderile de acizi biliari prin fecale sunt apreciate la aproximativ 0,5 g/zi.

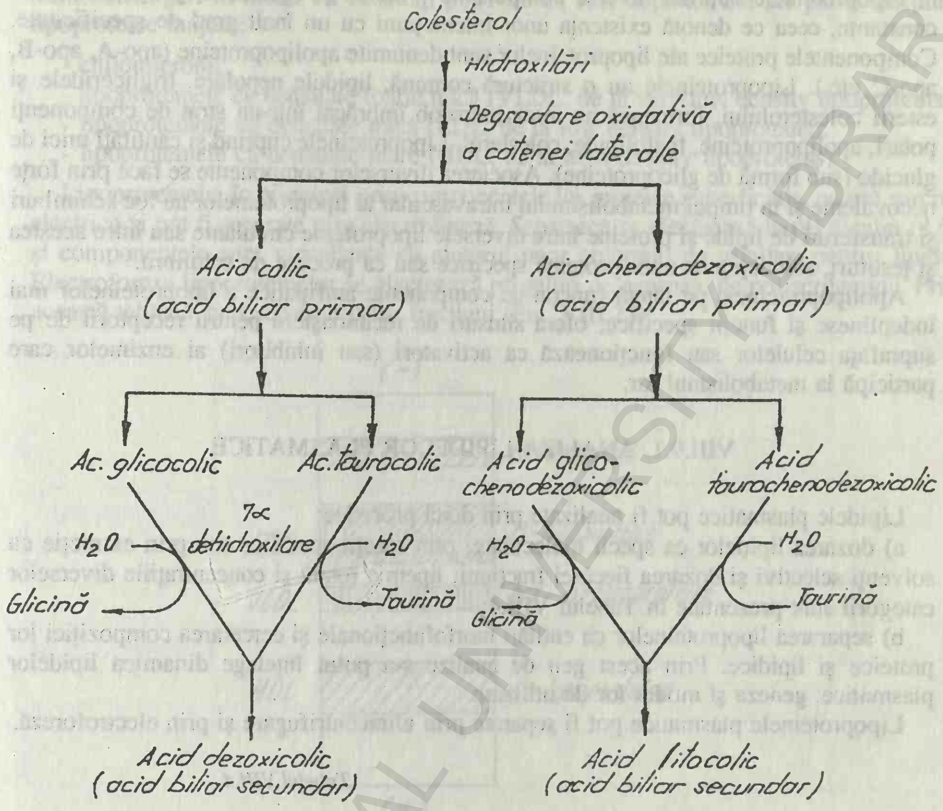


Fig. VIII. 24 - Metabolismul acizilor biliari

VIII.9. LIPIDELE PLASMATICE

Trigliceridele din ţesutul adipos şi din celelalte ţesuturi reprezintă cel mai important depozit de rezerve energetice ale organismului (aproximativ 135.000 kcal pentru un adult normal). Aceste depozite se formează din grăsimile ingerate în exces sau sunt forma de stocare a surplusului de glucide exogene. Transportul trigliceridelor alimentare şi a celor sintetizate endogen la locurile de depozitare şi apoi distribuţia lor către organele consumatoare presupune un flux plasmatic continuu de trigliceride şi de alte categorii de lipide. Trigliceridele hidrofobe se asociază cu alte lipide şi cu proteine sub formă de lipoproteine. Pe lângă transportul de trigliceride, lipoproteinele plasmatice mai au şi alte roluri:

- transportă colesterolul exogen şi cel sintetizat în ficat spre ţesuturile extrahepatice şi invers: vehiculează alţi compuşi lipidici (vitamine liposolubile);
- participă la păstrarea compoziţiei lipidice a membranelor;
- reglează procese metabolice celulare.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lipoproteinele cuprind diverse componente proteice şi lipidice în proporţii relativ constante, ceea ce denotă existenţa unor interacţiuni cu un înalt grad de specificitate. Componentele proteice ale lipoproteinelor sunt denumite apolipoproteine (apo-A, apo-B, apo-C etc.). Lipoproteinele au o structură comună, lipidele nepolare, trigliceridele şi esterii colesterolului, formează un miez hidrofob îmbrăcat într-un strat de componenţi polari, apolipoproteine, fosfolipide, colesterol. Lipoproteinele cuprind şi cantităţi mici de glucide (sub formă de glicoproteine). Asocierea diverselor componente se face prin forţe necovalente şi în timpul metabolismului intravascular al lipoproteinelor au loc schimburi şi transferuri de lipide şi proteine între diversele lipoproteine circulante sau între acestea şi ţesuturi, sub acţiunea unor proteine specifice sau ca procese de echilibru.

Apolipoproteinele pe lângă funcţia de componente amfipatice a lipoproteinelor mai îndeplinesc şi funcţii specifice, oferă situsuri de recunoaştere pentru receptorii de pe suprafaţa celulelor sau funcţionează ca activatori (sau inhibitori) ai enzimelor care participă la metabolismul lor.

VIII.9.1. ANALIZA LIPIDELOR PLASMATICE

Lipidele plasmatice pot fi analizate prin două procedee:

a) dozarea lipidelor ca specii moleculare, prin reacţii specifice sau prin extracţie cu solvenţi selectivi şi dozarea fiecărei fracţiuni; lipemia totală şi concentraţiile diverselor categorii sunt prezentate în Tabelul VIII.4;

b) separarea lipoproteinelor ca entităţi morfofuncţionale şi cercetarea compoziţiei lor proteice şi lipidice. Prin acest gen de analize s-a putut înţelege dinamica lipidelor plasmatice, geneza şi modul lor de utilizare.

Lipoproteinele plasmatice pot fi separate prin ultracentrifugare şi prin electroforeză.

Tabelul VIII.4

Concentraţia lipidelor serice (adult normal)
(după: Ministerul Sănătăţii şi Academia de Ştiinţe Medicale, Metode curente pentru analize de laborator clinic, Editura Medicală, 1982)

Lipide	*mg/dl*
Lipide totale	550 - 750
Trigliceride	30 - 140
Colesterol total	120 - 260
Fosfolipide totale	180 - 260
Acizi graşi liberi	12 - 16

Ultracentrifugarea are la bază diferenţele de densitate în raport cu conţinutul lipoproteinelor în lipide şi proteine. Trigliceridele pure au densităţi de 0,95 g/cm^3 o lipoproteină cu un conţinut egal de lipide şi proteine are o densitate de 1,065 g/cm^3; proteinele pure au densităţi mai mari de 1,28 g/cm^3. În câmpuri gravitaţionale puternice (de aproximativ 100.000 xg) lipoproteinele, după densitatea mediului de suspensie se vor sedimenta (dacă au densităţi mai mari decât ale mediului) sau vor flota, dacă au densităţi mai mici. Prin

ultracentrifugări în medii cu densităţi potrivite au fost obţinute din ser patru fracţiuni lipoproteice majore:

- chilomicronii;
- lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL, de la very low density lipoproteins);
- lipoproteinele cu densitate mică (LDL, de la low density lipoproteins);
- lipoproteinele cu densitate mare (HDL, de la high density lipoproteins).

Lipoproteinele, în principal prin componentele lor proteice superficiale, poartă sarcini electrice şi pot fi separate prin electroforeză. Separarea se efectuează la pH alcalin (8,6) şi componentele sunt vizualizate cu ajutorul unor coloranţi cu afinitate pentru lipide. Electroforeza lipoproteinelor se efectuează pe geluri de agaroză, de poliacrilamidă. Prin această tehnică sunt separate patru fracţiuni (Fig. VIII.25):

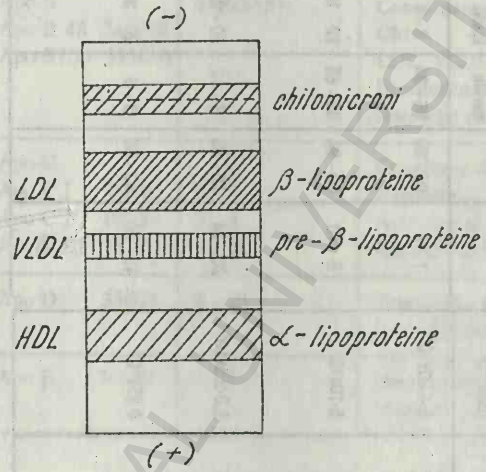


Fig. VIII. 25 - Fracţiunile lipoproteice care pot fi separate la electroforeză pe un suport solid a unui ser uman

- chilomicronii care nu migrează;
- pre-β-lipoproteinele;
- β-lipoproteinele;
- α-lipoproteinele.

Aceste fracţiuni corespund:

- pre-β-lipoproteine = VLDL
- β - lipoproteine = LDL
- α - lipoproteine = HDL

În Tabelul VIII.5 sunt prezentate unele date privind lipoproteinele plasmatice. De notat că serul obţinut din sânge normal recoltat dimineaţa după 8-10 ore de nemâncare (à jeun) nu cuprinde chilomicroni şi VLDL sunt prezenţi în urme. Acizii graşi liberi, asociaţi cu serum albumina, nu constituie o fracţiune lipoproteică propriu zisă. O importanţă deosebită pentru înţelegerea rolurilor şi a dinamicii concentraţiilor lipoproteinelor serice prezintă apolipoproteinele. În Tabelul VIII.6 sunt descrise principalele apolipoproteine, rolurile pe care le au, concentraţiile lor.

Tabelul VIII.5.

Lipoproteinele plasmatice

Fracţiunea lipoproteică	Sf	Densitate (g/cm^3)	Diametru (nm)	Greutatea moleculară (daltoni)	Proteine %	Lipide %					
						Total	Trigli-ceride	Fosfo-lipide	Colesterol	Acil-col.	Acizi graşi liberi
Chilomicroni	400	0,96	75 - 600	0,4-30x10^9	1 - 2	98 - 99	86 - 94	3 - 8	0,5 - 1	1 - 3	-
Lipoproteine cu densitate foarte mică, VLDL, pre-β-lipoproteine	20 - 400	0,96-1,009	25 - 75	5-10x10^6	5 - 10	89 - 94	55 - 65	12 - 18	6 - 8	12 - 14	-
Lipoproteine cu densitate mică, LDL, β-lipoproteine	0 - 20	1,006-1,063	20 - 25	2,2-3,5x10^6	20 - 24	75 - 80	8 - 12	20 - 25	5 - 10	35 - 40	-
Lipoproteine cu densitate mare, HDL, α-lipoproteine	-	1,065-1,125	10 - 20	0,25x10^6	45 - 50	50 - 55	3 - 6	20 - 30	3 - 5	14 - 18	-
Acizi graşi liberi, AGL		1,28	-	-	99	1	-	-	-	-	1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul VIII.6

Apolipoproteinele plasmatice

Apolipoproteina	*Greutate moleculară (daltoni)*	*Conc. în plasmă mg/dl (medii/limite)*	*Funcție*
Apolipoproteina A	Apo A Apo A I 28000 Apo A II 17000 Apo A III 46000	235(170-325) 150(90-210) 46(26-66) 14	Constituent major al HDL Activator al LCAT
Apolipoproteina B	Apo B Apo B 48 241000 Apo B100 513000	97(60-155)	Constituent major al: CM LDL, VLDL Biosinteza şi secreţia lipoproteinelor Interacţie cu receptori celulari
Apolipoproteina C	Apo C Apo C I 7000 Apo C II 10000 Apo C III 9000	 4 - 7 3 - 8 8 - 15	Constituent al CM, VLDL, HDL, LDL Activator al LCAT Activator al lipoproteinlipazei Inhibitor al lipoproteinlipazei
Apolipoproteina D	Apo D 35000	8 - 10	Transportor de colesterol esterificat între diverse lipoproteine
Apolipoproteina E	Apo E 36000	3 - 5	Interacţionează cu receptori din hepatocit

VIII. 9.2. CHILOMICRONII

Sunt lipoproteine cu un conţinut foarte mare de lipide (98-99%) şi puţine proteine (1-2%). Au dimensiuni mari, refractă lumina şi conferă plasmei un aspect lactescent. Au densităţi mai mici decât ale serului (1,006) şi prin păstrarea serului la rece chilomicronii se ridică la suprafaţă sub forma unui strat cremos. Chilomicronii sunt sintetizaţi în celulele mucoasei intestinale şi incorporează lipidele alimentare absorbite. Sunt secretaţi în vasele limfatice care drenează intestinul şi la nivelul canalului toracic trec în plasmă. Imediat după secreţie particulele au o compoziţie diferită de acelea circulante, de aceea se face distincţia între particulele primare, chilomicronii născânzi şi cele secundare, chilomicronii propriu-zişi. Particulele născânde cuprind apo-B48, apoA. Complementul de apolipoproteine C şi E îl dobândesc în plasmă prin transferul acestor proteine de la HDL.

Chilomicronii sunt prezenţi în plasmă după ingerare de alimente bogate în grăsimi. În Fig. VIII.26 se arată intensitatea răspunsului lipemic (creşterea trigliceridemiei după ingestia de grăsimi) şi durata acestui răspuns la subiecţii normali. După 6-7 ore de la ingestia de grăsimi chilomicronii dispar din sânge, plasma se clarifică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

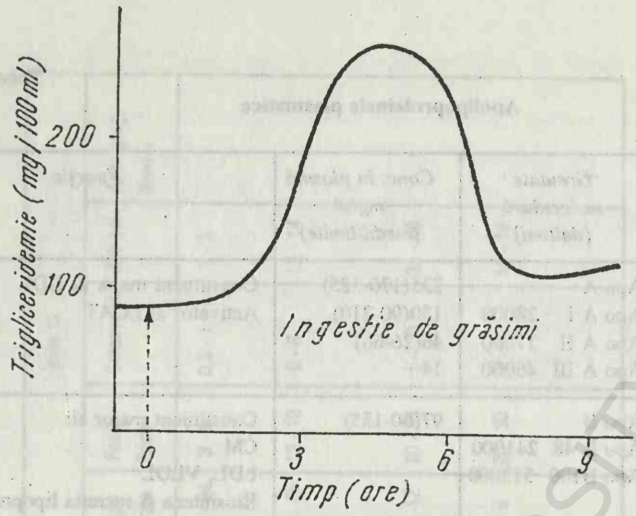


Fig. VIII. 26 - Modificarea lipemiei totale după ingestia de grăsimi (răspuns lipemic)

Catabolismul chilomicronilor are loc în două etape. În prima etapă trigliceridele componente sunt hidrolizate sub acţiunea lipoproteinlipazei.

Această enzimă (sau grup de enzime) acţionează specific asupra legăturilor 1 şi 3 din acilgliceroli formându-se 2-monoacilglicerol, compus hidrolizat mai departe la glicerol şi acizi graşi. Ţesuturile cele mai bogate în lipoproteinlipază sunt ţesutul adipos, muşchii scheletici, miocardul, glanda mamară, pulmon. Aceste ţesuturi utilizează acizi graşi pentru oxidare (muşchi), depozitare (ţesut adipos) sau secreţie de grăsimi (glanda mamară). Enzima se află pe suprafaţa luminală a endoteliului vascular fiind ancorată prin glicozaminoglicani. Heparina eliberează enzima în plasmă.

Lipoproteinlipaza este activată de apolipoproteina C II, component al chilomicronilor.

Lipoproteinlipazele din diverse ţesuturi au proprietăţi cinetice diferite. Enzima din inimă are afinitate mai mare pentru substrat (K_m mic) decât enzima din ţesutul adipos. Când nivelul chilomicronilor este scăzut, miocardul extrage cu viteză mai mare trigliceride plasmatice decât ţesutul adipos. Lipoproteinlipaza din ţesutul adipos atinge viteza maximă după ce enzima miocardică este deja saturată. În plus, activitatea lipoproteinlipazei în ţesutul adipos este reglată de factori nutriţionali şi hormonali. Activitatea enzimei creşte după ingestia de grăsimi şi/sau glucide. Aceste efecte sunt probabil mediate de insulină. Activitatea lipoproteinlipazei din glanda mamară este dependentă de stimularea prin prolactină, are activitate ridicată numai în perioadele de lactaţie.

Pe măsură ce hidroliza trigliceridelor avansează, componenţii superficiali devin supranumerari. Colesterolul liber, fosfolipidele, apolipoproteinele C sunt transferate pe HDL. Treptat chilomicronii devin „resturi chilomicronice".

A doua etapă a catabolismului chilomicronilor constă în captarea resturilor de către ficat, captare facilitată de apolipoproteina E. Componenţii resturilor chilomicronice sunt hidrolizaţi şi utilizaţi în mod specific. Pe această cale ajunge la ficat o parte din colesterolul exogen şi cel intestinal. Colesterolul eliberat din resturile chilomicronice inhibă HMG-CoA reductaza, reglând sinteza colesterolului în hepatocit.

Metabolismul chilomicronilor este perturbat la subiecţii cu deficite înăscute de lipoproteinlipază, de apo B. Boala familială, hiperchilomicronemie (hiperlipoproteinemie de tip I) este determinată de deficienţa în lipoproteinlipază. Concentraţia chilomicronilor, a trigliceridelor prezintă creşteri marcate şi persistente. Au loc depuneri de trigliceride în ţesuturi (xantoame). Incidenţa aterosclerozei la aceşti bolnavi este joasă.

Anomalia sintezei apolipoproteinei B-48 la nivel intestinal are drept urmare imposibilitatea formării chilomicronilor şi transportul lipidelor exogene. Se acumulează trigliceride în celulele intestinale şi consecutiv este perturbată absorbţia altor lipide din intestin (lipidele sunt eliminate prin fecale, steatoree), organismul este carenţat în vitamine liposolubile. Tabloul lipidic sanguin este modificat în sensul scăderii lipidelor totale, a trigliceridelor, a colesterolului.

VIII.9.3. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE FOARTE MICĂ (VLDL, pre-β-lipoproteine)

Aceste lipoproteine sunt sintetizate în ficat, au un conţinut ridicat de lipide (89-94%) între care predomină trigliceridele (55-65%), după care urmează fosfolipidele (12-18%), esteri ai colesterolului (12-14%) şi colesterol liber (6-8%). Au densităţi cuprinse între 0,96 şi 1,006 g/cm^3. Particulele născânde cuprind apo-B (B-100) drept componentă proteică majoritară. În plasmă VLDL născânde primesc apo-C şi apo-E de la HDL.

Funcţia principală a VLDL este transportul trigliceridelor sintetizate în ficat spre ţesuturile extrahepatice. Apolipoproteinele şi celelalte componente lipidice au roluri auxiliare în transportul trigliceridelor. VLDL sunt prezente în plasmă după ingerare de raţii bogate în glucide. Excesul caloric de glucoză este convertit în ficat în trigliceride şi exportat sub formă de VLDL. Sângele recoltat dimineaţa de la un subiect normal după un post de 8 - 10 ore, este practic lipsit de VLDL, acestea sunt catabolizate rapid sub acţiunea lipoproteinlipazei. În foame prelungită, în inaniţie, în diabet, plasma cuprinde VLDL ca urmare a unei sinteze crescute de trigliceride hepatice pe seama acizilor graşi liberi circulanţi.

Amplificarea sintezei de trigliceride hepatice şi/sau perturbarea căilor de sinteză şi de export a VLDL are drept consecinţă acumularea grăsimilor în ficat (ficat gras, steatoză, infiltraţie grăsoasă a ficatului). Această situaţie survine fie din cauza unei producţii crescute de trigliceride, care depăşeşte capacitatea ficatului de sinteză şi secreţie de VLDL, fie la un nivel normal de sinteză a trigliceridelor când formarea VLDL este perturbată prin deficit de proteine, de fosfolipide (fosfotidil-coline) sau ritmul de secreţie a VLDL este încetinit. Inhibitorii sintezei de proteine (antibioticul puromicină), deficienţa de colină sau a unei surse de grupări metil, deficienţa de acizi graşi esenţiali (acid linoleic), diverse toxice (CCl_4, fosfor, etanol) determină ficat gras. Agenţii care au acţiune protectoare sau favorizează exportul trigliceridelor hepatice sunt denumiţi factori lipotropi (metionina şi proteinele bogate în metionină, grăsimile nesaturate, vitamina E etc.).

VLDL circulante, îmbogăţite în apo-C II, activator al lipoproteinlipazei, sunt supuse acţiunii acestei enzime care hidrolizează trigliceridele. Glicerolul este eliberat în plasmă, iar acizii graşi sunt captaţi în ţesuturi. Progresiv cu scăderea trigliceridelor are loc şi pierderea de apo-C II care trece pe HDL. În acelaşi timp particulele se îmbogăţesc în

colesterol, furnizat de către HDL. Apoliproproteina D componentă a HDL funcţionează ca o acil-colesterolester-transferază şi colesterolul esterificat este transferat din HDL pe VLDL.

Îmbogăţirea VLDL în colesterol mai poate avea loc cu participarea lecitin ⟶ colesterolacil transferazei (LCAT) enzimă plasmatică. Apolipoproteina C I, component al VLDL, activează această enzimă.

LCAT catalizează reacţia:

Lecitină + colesterol ⟶ 2 – lizolecitină + acilcolesterol.

Lizolecitina mai hidrofilă este eliberată în plasmă, iar acilcolesterolul apolar migrează în miezul particulei. Locurile superficiale eliberate vor fi ocupate cu colesterol furnizat de HDL. Nu se cunoaşte încă ponderea relativă a celor două căi de îmbogăţire a VLDL în colesterol.

Paralel cu hidroliza trigliceridelor, îmbogăţirea în colesterol, apolipoproteinle C trec la HDL. Apolipoproteina B este însă păstrată, fiind regăsită integral în particulele IDL (intermediate density lipoproteins) şi apoi în LDL care rezultă din VLDL. În cursul acestor transformări diametrul particulelor scade de la 25-75 nm la 20-25 nm, greutatea moleculară reducându-se aproximativ la jumătate.

VIII.9.4. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MICĂ (LDL, β-lipoproteine)

Sunt particule lipoproteice cu densităţi cuprinse între 1,006 şi 1,063 şi diametre de 20-25 nm. Au un conţinut lipidic de 75-80%, componenta majoritară fiind colesterol, 35-40% colesterol esterificat, 5-10% colesterol liber, 20-25% fosfolipide şi numai 8-12% trigliceride. Apolipoproteina majoritară este apo B-100.

LDL se formează în plasmă din VLDL după îndepărtarea trigliceridelor VLDL sub acţiunea lipoproteinlipazei şi îmbogăţire în colesterol. LDL sunt prezente în sângele recoltat dimineaţa după un post de 8-10 ore şi cuprinde aproximativ 70% din colesterolul total plasmatic (Tabelul VIII.7).

Tabelul VIII.7

Concentraţiile colesterolului total, LDL - colesterol şi HDL-colesterol în ser

Colesterol	*mg/dl*	*mmol/l*
Colesterol total	220 - 260	5,7 - 6,7
LDL - colesterol	150 - 190	3,9 - 4,9
HDL-colesterol (bărbaţi)	35 - 55	0,9 - 1,4
HDL-colesterol (femei)	45 - 65	1,2 - 1,7

LDL au rolul de a furniza colesterol diverselor ţesuturi. Mecanismul de transfer al colesterolului din LDL în ţesuturi a fost descris de Goldstein şi Brown (1976). Calea LDL descrisă de Goldstein şi Brown constituie totodată şi un mecanism de reglare a captării, depozitării şi sintezei de colesterol în ţesuturi, de prevenire a acumulărilor sale în celule.

Calea LDL cuprinde mai multe etape:

a) LDL plasmatice prin intermediul apo B-100 şi apo E interacţionează cu receptori specifici de pe suprafaţa celulelor.

Receptorul LDL este o glicoproteină cu 839 aminoacizi. Este organizat în cinci domenii structurale, trei extracelulare, unul membranar şi unul citoplasmatic (Fig. VIII.27). Domeniul C-terminal, citosolic, participă la endocitoza receptorilor ocupaţi cu LDL. Domeniul membranar cuprinde 22 aminoacizi, în majoritate hidrofobi. Domeniul N-terminal cuprinde situsul de recunoaştere a apo B-100 şi apo E şi de legare a LDL. Următorul domeniu cuprinzând aproximativ 400 aminoacizi se remarcă prin omologia sa structurală cu precursorul EGF (factorul de creştere a epidermei). Nu se cunoaşte ce funcţie are acest domeniu în receptorul LDL. Cel de al treilea domeniu extracelular, cu 58 aminoacizi, este intens glicozilat. Numărul de receptori pe un anumit tip de celulă este variabil, este reglat printr-un mecanism feedback de concentraţia LDL în spaţiul extracelular.

b) Lipoproteinele fixate pe receptori sunt translocate în interiorul celulei după care particulele lipoproteice fuzionează cu lizozomii (endocitoză).

c) În lizozomi componentele LDL, proteine, fosfolipide, acilcolesterol, trigliceride sunt hidrolizate de enzimele lizozomale. Colesterolul liber este utilizat în parte pentru nevoile proprii ale celulei (pentru construcţia membranelor, sinteză de hormoni steroidici, de acizi biliari) iar ceea ce prisoseşte este esterificat şi depozitat în celulă. Această reacţie este catalizată de o acil-CoA ⟶ colesterol acil transferază (ACAT) rezultând esteri ai colesterolului cu diverşi acizi celulari, în principal acid palmitic, acid palmitoleic, acid oleic. De notat că esterii colesterolului din lipoproteinele plasmatice cuprind în majoritate rest linoleil.

Colesterolul liber furnizat celulelor de LDL exercită o acţiune represivă asupra sintezei de novo a colesterolului, prin inhibiţia HMG-CoA reductazei şi sinteza colesterolului în ţesuturile extrahepatice este menţinută la un nivel scăzut.

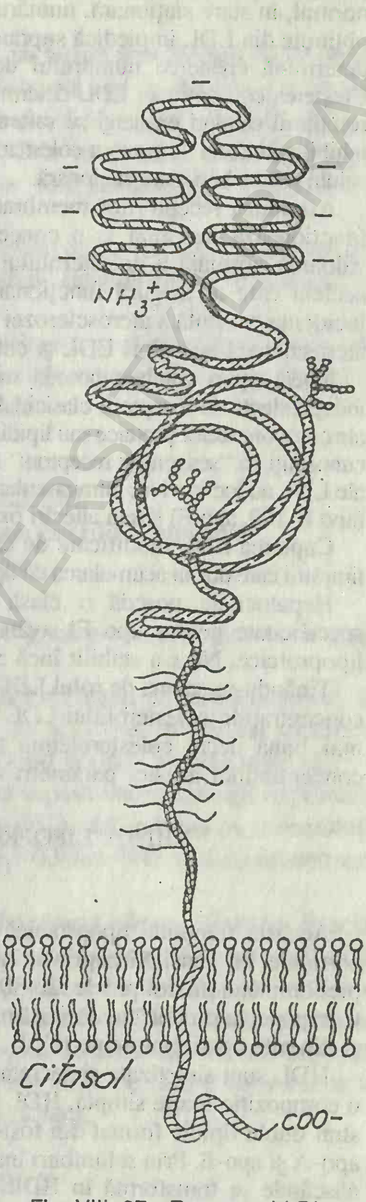


Fig. VIII. 27 - Receptorul LDL

Calea LDL pe lângă reglarea cantităţii de colesterol intracelular intervine şi în reglarea nivelului plasmatic al LDL. Numărul de receptori pentru LDL variază cu cantitatea de particule lipoproteice la care sunt expuse celulele, există o relaţie inversă între concentraţia LDL şi numărul de receptori. În acest fel se previne acumularea colesterolului în celule şi, pe de altă parte, face posibilă acoperirea nevoilor celulare în colesterol la niveluri scăzute de lipoproteine extracelulare. În mod

normal, în stare staţionară, numărul de receptori este mijlociu şi cantităţile de colesterol obţinute din LDL împiedică supraacumularea colesterolului. Scăderea concentraţiei LDL determină creşterea numărului de receptori membranari şi intensificarea captării LDL. Creşterea concentraţiei LDL determină modificări inverse celor de mai sus. În primul rând, receptorii celulari existenţi se saturează cu LDL furnizând celulei mult colesterol. Pe lângă inhibiţia sintezei de novo a colesterolului are loc şi o scădere a numărului de receptori LDL, celula revine la o stare staţionară.

Afinitatea receptorilor membranari pentru LDL este foarte mare, se evaluează că ei funcţionează maximal la o concentraţie a colesterolului - LDL de 25 mg/dl. La om valoarea normală a colesterolului - LDL este de 120 mg/dl, valoare mult superioară aceleia care ar asigura funcţionarea optimală a receptorilor LDL. Acest fapt explică incidenţa crescută a aterosclerozei la om. Într-adevăr, speciile care nu fac în mod normal ateroscleroză au valori LDL şi colesterol - LDL apropiate de cele ideale.

Unele tipuri celulare posedă mecanisme alternative de înglobare a LDL, mecanisme independente de receptorii clasici LDL. Macrofagele încorporează LDL care prezintă alterări ale componentelor proteice sau lipidice. Receptorii care recunosc astfel de LDL modificate sunt cunoscuţi ca "scavenger receptors" sau receptori pentru acetil-LDL. Modificările biochimice ale LDL au loc in vivo, intravascular şi pot consta în acetilări, glicozilări ale apolipoproteinelor (apo B-100, apo E) şi/sau alterări oxidative ale componentelor lipidice nesaturate.

Captarea LDL modificate de către macrofage constituie unul din procesele cele mai timpurii care duc la acumularea de lipide în pereţii arterelor şi formarea plăcilor atermomatoase.

Hepatocitele posedă o clasă distinctă de receptori pentru LDL (care prezintă specificitate pentru apo E) având astfel capacitatea de a internaliza aceste particule lipoproteice. Nu s-a stabilit încă ce pondere are ficatul în catabolismul final al LDL.

Ţinându-se seama de rolul LDL, furnizor de colesterol pentru ţesuturile extrahepatice, concentraţiile colesterolului-LDL şi apolipoproteinei B 100 au valoare predictivă mult mai bună decât colesterolemia totală ca factori de risc în ateroscleroză. Creşterile concentraţiilor acestor parametri se corelează cu riscul de a face ateroscleroză.

VIII.9.5. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MARE (HDL, α-lipoproteine)

Această fracţiune lipoproteică este alcătuită dintr-o populaţie foarte heterogenă de particule, cu densităţi cuprinse între 1,065 şi 1,125. Au un conţinut lipidic de 50-55%, predominând fosfolipidele 20-30%, colesterolul 17-23% şi puţine trigliceride 3-6%. Componenta proteică majoritară este apo-A (apo-A I, apo-A II) dar cuprind cantităţi mici şi din alte apolipoproteine (C, D, E). Nu cuprind însă apo-B.

HDL sunt sintetizate şi secretate de hepatocite sub forma unor particule născânde cu o compoziţie foarte simplă. HDL născânde au o formă discoidală, sunt alcătuite dintr-un strat dublu lipidic format din fosfolipide, colesterol liber şi apolipoproteine în principal, apo-A şi apo-E. Prin schimburi între celelalte lipoproteine plasmatice şi celule particulele născânde se transformă în HDL mature. În aceste transformări un rol deosebit îl are LCAT plasmatică (lecitincolesterol acil transferază) activată de apo-A II component al HDL născânde. Sub acţiunea acestei enzime colesterolul este esterificat la acil-colesterol:

lecitină + colesterol ⟶ lizolecitină + linoleil - colesterol.

Colesterolul esterificat migrează în interiorul particulei constituind un miez hidrofob. Locurile rămase vacante în stratul superficial al HDL sunt ocupate de colesterol preluat

din ţesuturi şi din alte lipoproteine plasmatice (chilomicroni). Conţinutul în colesterol al HDL creşte până la nivelul particulelor mature.

HDL sunt lipoproteine prezente în sângele recoltat de la un subiect normal (după 8 - 10 ore de post) alături de LDL. HDL cuprind aproximativ 30% din colesterolul total din plasmă. Colesterolul-HDL este mai mare la femei (45-65 mg/dl) decât la bărbaţi (35-55 mg/dl) (Tabelul VIII.7).

HDL sunt catabolizaţi în final la nivelul ficatului. Prin intermediul apo-E particulele interacţionează cu receptori de pe suprafaţa hepatocitelor, sunt internalizaţi şi componentele degradate.

HDL joacă un rol important în metabolismul colesterolului, participă la transportul acestuia din ţesuturile extrahepatice în ficat, sediul catabolismului colesterolului (transformare în acizi biliari şi excreţie prin bilă).

Concentraţiile colesterolului - HDL şi apolipoproteinei-A sunt consideraţi factori de risc pozitiv în ateroscleroză. Subiecţii care prezintă nivelele ridicate ale acestor parametri sunt protejaţi, au un risc scăzut de a face ateroscleroză.

VIII.9.6. ACIZI GRAŞI LIBERI

(AGL, acizi graşi neesterificaţi, NEFA = non esterified fatty acids, FFA = free fatty acids)

Această fracţiune lipidică este constituită din acizii graşi prezenţi în plasmă ca atare şi nu drept constituenţi ai altor lipide.

Acizii graşi sunt greu solubili în apă, şi în plasmă sunt legaţi de serumalbumină. O moleculă de serumalbumină poate lega 7 molecule de acid gras în situsuri specifice. Capacitatea serumalbuminei de a lega acizi graşi, în mod normal, nu este saturată.

Concentraţia acizilor graşi în plasmă este mică dar supusă unor fluctuaţii importante în raport cu factori nutriţionali şi hormonali. În perioada postabsorbtivă au concentraţii de aproximativ 0,5 nmoli/l, în foame cresc moderat (0,7-0,9 nmoli/l). În diabetul netratat, în inaniţie ating nivelele de până la 2 nmoli/l.

Acizii graşi liberi din plasmă provin în majoritate din ţesutul adipos, cantitatea de acizi graşi exportată de ţesutul adipos depinzând de balanţa dintre lipoliză şi lipogeneză. AGL sunt captaţi de către diverse ţesuturi şi utilizaţi energogen. Cu excepţia creierului şi hematiilor toate celelalte ţesuturi extrag acizi graşi din plasmă. Când nivelul plasmatic al AGL este ridicat, capacitatea de utilizare de către ţesuturile extrahepatice este depăşită. În aceste condiţii ficatul captează o proporţie mare din AGL pe care îi converteşte în trigliceride, pe care le exportă ca VLDL şi în corpi cetonici.

VIII.9.7. DISLIPIDEMIILE

Plasma vehiculează cantităţi importante de lipide care suferă oscilaţii ample în raport cu diverşi factori nutriţionali, metabolici sau hormonali, prin modificarea vitezei influxului sau efluxului lor plasmatic. Studii epidemiologice întreprinse în ultimele decenii au stabilit o corelaţie strânsă între modificările lipidelor sanguine şi incidenţa bolilor cardiovasculare, a aterosclerozei.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modificarea concentraţiei lipidelor totale plasmatice, a uneia dintre fracţiuni sau alterarea raportului dintre diversele componente este denumită dislipidemie. Dacă ţinem seama că lipidele sunt incorporate în lipoproteine rezultă că orice dislipidemie este o dislipoproteinemie.

Dislipoproteinemiile sunt hiper- şi hipolipoproteinemii, ultimele fiind mult mai rar întâlnite decât primele. Hiperlipoproteinemiile constau în creşterea concentraţiei fracţiunilor normale LDL (β-lipoproteine) şi HDL (α-lipoproteine) sau apariţia şi persistenţa în ser a chilomicronilor şi/sau a VLDL (pre-β-lipoproteine), lipoproteine care sunt practic absente într-un ser recoltat dimineaţa după o noapte de post. Dislipidemiile ereditare, familiale, sunt datorate alterării genelor care controlează sinteza, transportul sau utilizarea lipoproteinelor. În alte cazuri alterarea tabloului lipidic sanguin este secundară altor maladii.

Hiperlipoproteinemiile primare, familiale, au fost clasificate după Fredrickson în cinci tipuri, I-V, tipul II manifestându-se în două variante II a şi II b. În Tabelul VIII.8 şi Fig. VIII.28 sunt date caracteristicile hiperlipoproteinemiilor primare în formele lor tipice. În practică tabloul lipidic sanguin, manifestările clinice, pot fi mult mai heterogene, în funcţie de exprimarea genei defecte, de momentul evoluţiei bolii.

Tabelul VIII.8

Hiperlipoproteinemiile familiale

Tipul	*Vârsta la care se manifestă*	*Aspecte biochimice*	*Manifestări clinice*
I	Copilărie	Hiperchilomicronemie Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, lipemia retinalis, hepatosplenomegalie, dureri abdominale
II a	La orice vârstă	LDL crescute Hipercolesterolemie	Xantomatoză, boală vasculară aterioscleroticǎ prematură
II b	La orice vârstă	LDL şi VLDL crescute Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Obezitate, lipsesc xantoamele, boală vasculară aterioscleroticǎ prematură
III	Adult	VLDL cu conţinut ridicat în colesterol şi mobilitate anormală. Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, boală vasculară aterioscleroticǎ accelerată
IV	Adult	VLDL crescute Hipertrigliceridemie	Obezitate, boală vasculară aterioscleroticǎ prematură, hepatosplenomegalie, hiperuricemie
V	Adolescenţă	Chilomicronemie VLDL crescute Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, lipemia retinalis, boală vasculară arterioscleroticǎ prematură

Hiperlipoproteinemia de tip I (hiperchilomicronemie, hipertrigliceridemie exogenă majoră). Caracteristic pentru această dislipidemie este prezenţa chilomicronilor în cantitate mare. Răspunsul lipemic (creşterea postprandială a lipidemiei) la aceşti bolnavi este foarte intens şi persistent.

Serul are un aspect lăptos şi prin păstrare la rece separă un strat cremos de trigliceride. Lipidograma cuprinde o bandă intensă în regiunea chilomicronilor. Trigliceridemia este crescută, colesterolul prezintă creşteri mai moderate. Defectul biochimic al acestei dislipidemii constă într-o deficienţă a lipoproteinlipazei, enzimă implicată în delipidarea chilomicronilor şi epurarea lor plasmatică. Boala se manifestă clinic din primele luni de viaţă prin dureri abdominale, hepatosplenomegalie. Au loc depuneri de grăsimi în ţesuturi (xantoame). Incidenţa aterosclerozei este scăzută.

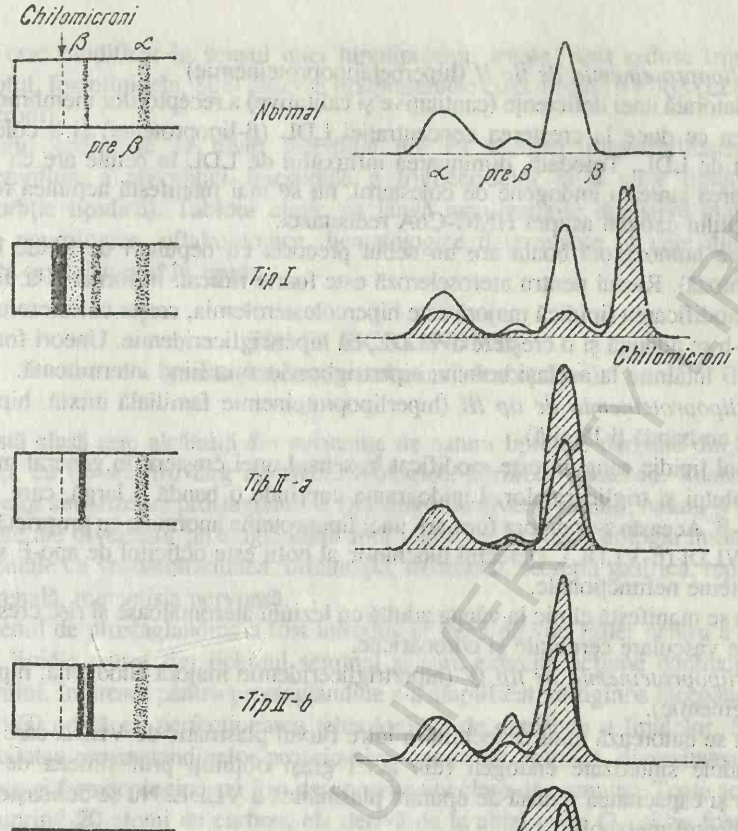


Fig. VIII. 28 - Modificările lipidogramei în diverse dislipoproteinemii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hiperlipoproteinemia de tip II (hiperbetalipoproteinemie)

Este datorată unei deficienţe (cantitative şi calitative) a receptorilor membranari pentru LDL ceea ce duce la creşterea concentraţiei LDL (β-lipoproteine) şi a colesterolului vehiculat de LDL. Totodată, diminuarea influxului de LDL în celule are ca rezultat şi amplificarea sintezei endogene de colesterol, nu se mai manifestă acţiunea represivă a colesterolului exogen asupra HMG-CoA reductazei.

În stare homozigotă boala are un debut precoce, cu depuneri de lipide în ţesuturi (xantomatoză). Riscul pentru ateroscleroză este foarte ridicat. În forma II-a, forma pură a bolii, modificarea lipidică majoră este hipercolesterolemia, creşte colesterolul-LDL. În forma II-b se adaugă şi o creştere a VLDL, cu hipertrigliceridemie. Uneori forma II-a şi II-b pot fi întâlnite la acelaşi bolnav, hipertrigliceridemia fiind intermitentă.

Hiperlipoproteinemia de tip III (hiperlipoproteinemie familială mixtă, hiperlipoproteinemie cu bandă β lărgită).

Tabloul lipidic sanguin este modificat în sensul unei creşteri, în general moderate, a colesterolului şi trigliceridelor. Lipidograma cuprinde o bandă β largă, care acoperă şi zona pre-β. Aceasta s-ar datora formării unei lipoproteine anormale cu proprietăţi comune LDL şi VLDl (β-VLDL). Defectul biochimic al bolii este deficitul de apo-E sau sinteza unei proteine nefuncţionale.

Boala se manifestă clinic la vârsta adultă cu leziuni ateromatoase şi risc crescut pentru accidente vasculare cerebrale şi coronariene.

Hiperlipoproteinemia de tip IV (hipertrigliceridemie majoră endogenă, hiperprebetalipoproteinemie).

Boala se datorează unui dezechilibru între fluxul plasmatic de VLDL care transportă trigliceridele sintetizate endogen (din acizi graşi obţinuţi prin sinteza de novo din glucoză) şi capacitatea redusă de epurare plasmatică a VLDL. Nu se cunoaşte unde este situat defectul metabolic.

Tabloul lipidic este modificat în sensul creşterii concentraţiei VLDL şi a trigliceridelor; colesterolul este normal sau moderat crescut.

Manifestările clinice devin evidente la adult, fiind adesea asociate cu diabet, obezitate.

Modificările lipidice caracteristice hiperlipoproteinemiei de tip IV sunt comune cu acelea induse de toxice, alcoolism, consum exagerat de glucide.

Hiperlipoproteinemia de tip V (hipertrigliceridemie majoră endogenă şi exogenă, hiperprebetalipoproteinemie cu hiperchilomicronemie). În această hiperlipoproteinemie trigliceridemia este crescută atât pe seama chilomicronilor (care transportă grăsimile exogene) cât şi pe seama VLDL (care transportă trigliceridele endogene). Lipidemia creşte după mese bogate în lipide şi/sau glucide.

Manifestările clinice apar la vârsta adultă, dureri andominale, xantoame eruptive, hepatosplenomegalie. Risc crescut pentru boli vasculare aterosclerotice.

Hipolipoproteinemiile familiale

Deficitul congenital de α-lipoproteine (deficit familial de HDL, boala Tangier). Boala este determinată de un deficit al sintezei de apo-A, component proteic al HDL. Concentraţia plasmatică a HDL este redusă, ca şi colesterolul-HDL şi fosfolipidele.

În numeroase celule, macrofage, celule musculare netede, celule Schwann se acumulează colesterol. Boala se manifestă precoce, cu splenomegalie, anomalii neurologice, hipertrofie amigdaliană.

Abetalipoproteinemia familială. Este determinată de o sinteză defectuoasă (cantitativ sau calitativ) a apo-B şi apo-C, apolipoproteine din chilomicroni şi VLDL. Tabloul lipidic

sanguin este modificat în sensul unei hipolipidemii totale, sunt reduse trigliceridele, colesterolul, fosfolipidele. Sunt absente lipoproteinele cu densitate <1,063 (LDL, VLDL, chilomicroni).

Deficitul enzimatic la nivel intestinal are ca rezultat imposibilitatea formării chilomicronilor, a absorbţiei intestinale a trigliceridelor şi a altor lipide exogene (malabsorbţie lipidică). Tabloul clinic pe lângă manifestările digestive mai cuprinde tulburări neurologice, oftalmologice, hematologice determinate în cele din urmă de deficienţa organismului în lipide.

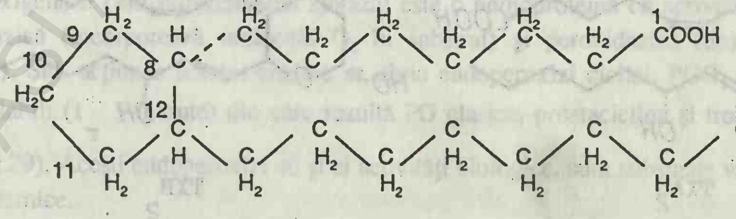
VIII.10. EICOSANOIZII
(prostaglandine, tromboxani, leucotriene)

Această clasă este alcătuită din substanţe de natura lipidică, derivate din acizi graşi nesaturaţi, cu un spectru larg de efecte biologice, hormoni paracrini. Toate ţesuturile mamiferelor sintetizează prostaglandine ca răspuns la diverşi stimuli, natura şi concentraţiile locale ale diverselor prostaglandine sunt implicate în fiziopatologia multor procese fundamentale ca vasomotricitatea, inflamaţia, tromboza, secreţia gastrică, reproducerea, funcţia renală, transmisia nervoasă.

Termenul de prostaglandine a fost introdus în 1935 de von Euler pentru a descrie un material lipidic extras din lichidul seminal şi care exercită acţiune contractilă asupra miometrului. Interesul pentru prostaglandine s-a amplificat vertiginos începând din jurul anului 1960 odată cu perfecţionarea tehnologiilor de cercetare a lipidelor. S-a stabilit multiplicitatea prostaglandinelor propriu-zise, natura lor chimică, diversitatea acţiunilor fiziologice şi farmacologice, au fost descoperite noi clase de compuşi. Toate aceste lipide active cuprind 20 atomi de carbon, ele derivă de la acizi graşi C_{20} şi au fost denumite „eicosanoizi" (de la alcanul $C_{20}H_{42}$, eicosan). Grupul eicosanoizilor cuprinde:
- prostaglandinele „primare" sau „clasice" (PG);
- endoperoxizii prostaglandinici (PGG_2, PGH_2);
- prostaciclina (PGI_2);
- tromboxanii (TX);
- leucotrienele (LT).

Structura chimică

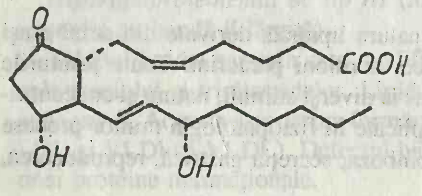
Prostaglandinele sunt, formal, derivaţi a unui acid gras C20, ipotetic, acid prostanoic:



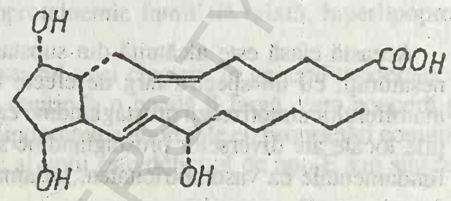
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diversele PG se deosebesc prin natura substituenţilor din nucleul pentanic (şi unde este cazul prin izomeria geometrică α/β) şi alcătuiesc seriile PGA-PGI. Catenele laterale se pot diferenţia prin numărul dublelor legături, care este desemnat printr-un indice inferior PG_1, PG_2, PG_3. La om cele mai abundente PG sunt acelea din subseria 2 derivate din acidul arahidonic (acid $\Delta^{5,8,11,14}$ - eisosatetraenoic). Acidul $\Delta^{8,11,14}$ - eicosatrienoic (acid dihomo-γ-linolenic) dă naştere la subseria PG_1; de la un acid eicosapentaenoic derivă subseria PG_3.

Dintre prostaglandinele primare, la om cele mai importante sunt PGE_2 şi $PGF_{2\alpha}$ cu structurile:

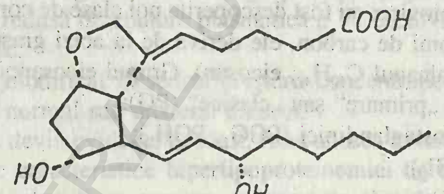


PGE_2

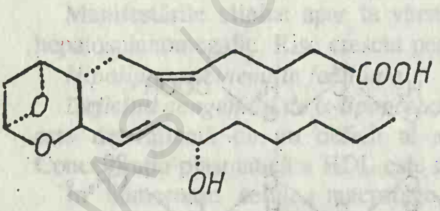


$PGF_{2\alpha}$

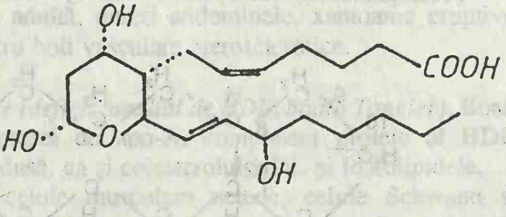
Prostaciclina (PGI) are structura:



Tromboxanii cuprind un heterociclu piranic (cu oxigen). TXA_2, foarte instabil, trece uşor (enzimatic sau neenzimatic) în TXB_2, prin hidroliza punţii interne eterice:



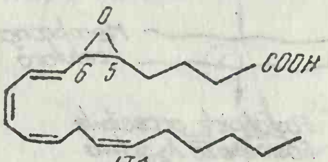
TXA_2



TXB_2

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Leucotrienele (LTA, LTB, LTC, LTD, LTE) sunt acizi graşi C_{20} ce cuprind trei legături duble conjugate. Compusul cel mai activ este LTA_4:



LTA4

VII.10.1. BIOSINTEZA EICOSANOIZILOR

Sinteza de eicosanoizi are loc la nivelul tuturor ţesuturilor, fiecare tip de celulă este aptă să sintetizeze una sau mai multe substanţe din această clasă. Eicosanoizii, spre deosebire de alţi mediatori chimici (hormoni, neurotransmitători), nu sunt depozitaţi în celule, ca atare sau sub formă de precursori, după sinteză sunt eliberaţi şi acţionează imediat. Sinteza de prostaglandine este declanşată de o diversitate foarte mare de stimuli (umorali, electrici, mecanici etc.) ce ajung la nivelul membranelor celulare. Prima etapă a cascadei de reacţii care duce la sinteza şi eliberarea de eicosanoizi este o modificare a „stării fosfolipidelor membranare“ şi/sau activarea fosfolipazei A_2 care atacă hidrolitic legătura esterică din poziţia 2 a glicerofosfolipidelor (fosfatidilcoline, fosfatidilinozitoli) eliberând un acid gras, de regulă acid arahidonic. De la acidul arahidonic pornesc două căi biosintetice, după cum asupra lui acţionează ciclooxigeneza (PG sintază) sau lipoxigenaza (Fig. VIII.29 şi VIII.30). Cantitatea, seria şi subseria de PG sintetizate de diverse celule depinde de:

- natura substratului disponibil (acid eicosatrienoic, tetraenoic sau pentaenoic);
- echipamentul enzimatic celular, de balanţa dintre ciclooxigenază şi lipoxigenază, de prezenţa altor enzime specifice unora dintre ramificaţii;
- prezenţa de inhibitori specifici ai uneia dintre căi;
- natura stimulului, traumă, ischemie, catecolamine etc.

Ciclooxigenaza (sau prostaglandin sintaza) este o hemoproteină cu activitate dublă, dioxigenazică (incorporează molecula O_2 în substrat) şi peroxidazică (descompune peroxidul). Sub acţiunea acestei enzime se obţin endoperoxizi ciclici, PGG_2 şi PGH_2, compuşi labili ($t_{\frac{1}{2}}$ 5 minute) din care rezultă PG clasice, prostaciclina şi tromboxanii (Fig. VIII.29). Aceşti endoperoxizi au şi ei activităţi biologice, sunt substanţe vasoactive foarte puternice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

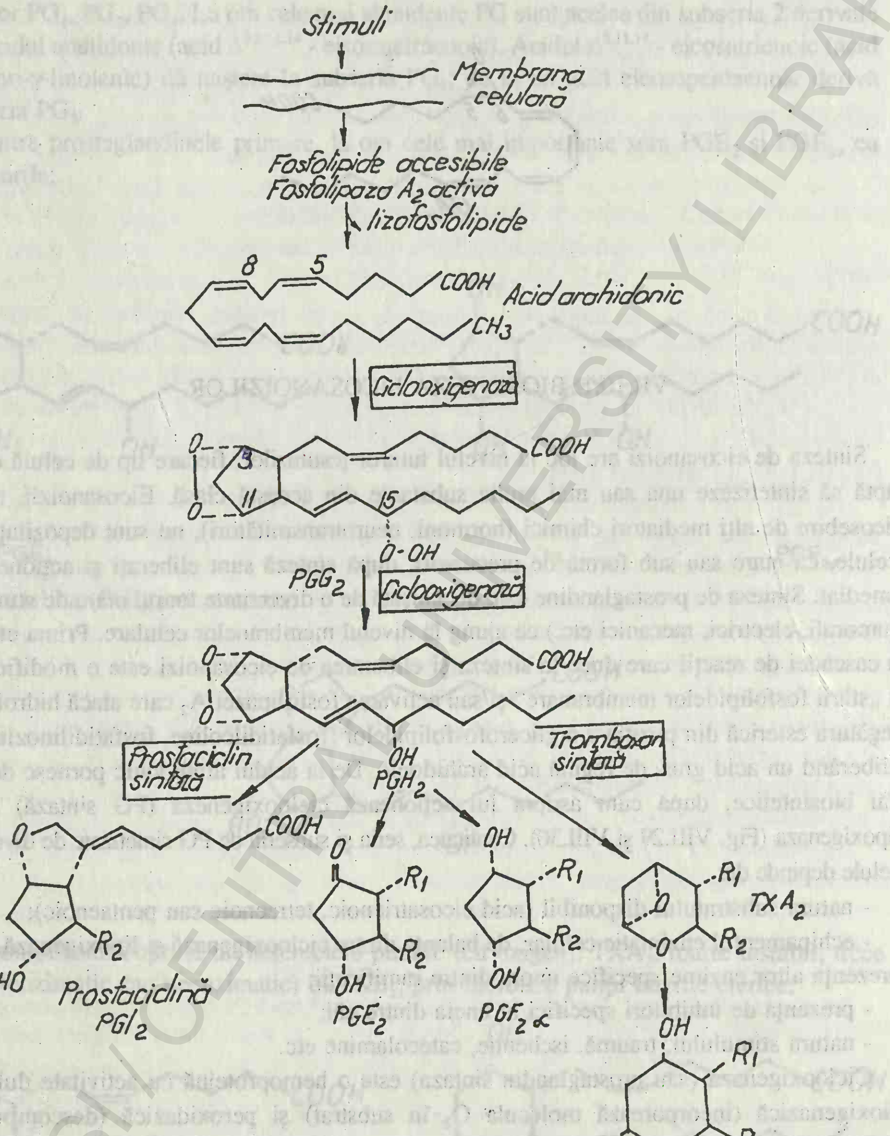


Fig. VIII. 29 - Biosinteza prostaglandinelor: prostaciclină, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, tromboxani

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

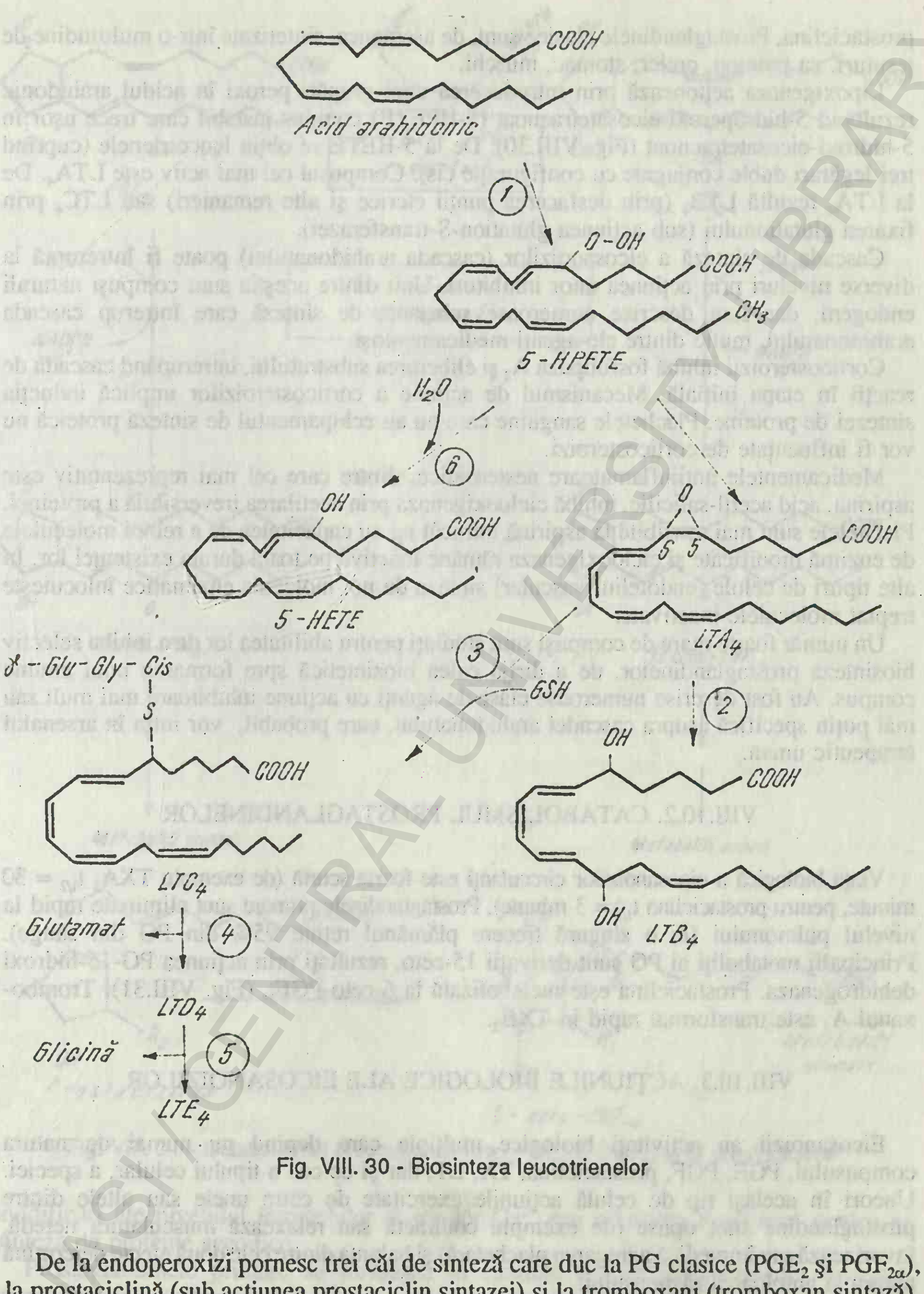


Fig. VIII. 30 - Biosinteza leucotrienelor

De la endoperoxizi pornesc trei căi de sinteză care duc la PG clasice (PGE_2 şi $PGF_{2\alpha}$), la prostaciclină (sub acţiunea prostaciclin sintazei) şi la tromboxani (tromboxan sintază). Profilul enzimatic specific fiecărui ţesut va determina predominenţa uneia sau alteia dintre aceste căi. Tromboxan sintaza este mai abundentă în creier, inimă, fibroblaşti de pulmon, splină, leucocite, plachete. Endoteliul vascular, inima şi multe alte ţesuturi sintetizează

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prostaciclina. Prostaglandinele clasice sunt, de asemenea, sintetizate într-o multitudine de ţesuturi, ca pulmon, creier, stomac, muşchi.

Lipoxigenaza acţionează prin introducerea unei grupări peroxi în acidul arahidonic rezultând 5-hidroperoxi-eicosatetraenoat (5-HPETE) compus instabil care trece uşor în 5-hidroxi-eicosatetraenoat (Fig. VIII.30). De la 5-HETE se obţin leucotrienele (cuprind trei legături duble conjugate cu configuraţie cis). Compusul cel mai activ este LTA_4. De la LTA_4 rezultă LTB_4 (prin desfacerea punţii eterice şi alte remanieri) sau LTC_4 prin fixarea glutationului (sub acţiunea glutation-S-transferazei).

Cascada de sinteză a eicosanoizilor (cascada arahidonatului) poate fi întreruptă la diverse niveluri prin acţiunea unor inhibitori. Unii dintre aceştia sunt compuşi naturali endogeni, dar sunt descrise numeroase substanţe de sinteză care întrerup cascada arahidonatului, multe dintre ele agenţi medicamentoşi.

Corticosteroizii inhibă fosfolipaza A_2 şi eliberarea substratului, întrerupând cascada de reacţii în etapa iniţială. Mecanismul de acţiune a corticosteroizilor implică inducţia sintezei de proteine. Plachetele sanguine care nu au echipamentul de sinteză proteică nu vor fi influenţate de corticosteroizi.

Medicamentele antiinflamatoare nesteroidice, dintre care cel mai reprezentativ este aspirina, acid acetil-salicilic, inhibă ciclooxigenaza prin acetilarea ireversibilă a proteinei. Plachetele sunt mai sensibile la aspirină întrucât nu au capacitatea de a reînoi moleculele de enzimă modificate şi ciclooxigenaza rămâne inactivă pe toată durata existenţei lor. În alte tipuri de celule (endoteliul vascular) sinteza de noi molecule enzimatice înlocuieşte treptat moleculele inactivate.

Un număr foarte mare de compuşi sunt studiaţi pentru abilitatea lor de a inhiba selectiv biosinteza prostaglandinelor, de a dirija calea biosintetică spre formarea unui anume compus. Au fost descrise numeroase clase de agenţi cu acţiune inhibitoare mai mult sau mai puţin specifică asupra cascadei arahidonatului, care probabil, vor intra în arsenalul terapeutic uman.

VIII.10.2. CATABOLISMUL PROSTAGLANDINELOR

Viaţa biologică a eicosanoizilor circculanţi este foarte scurtă (de exemplu TXA_2 $t_{1/2}$ = 30 minute, pentru prostaciclina $t_{1/2}$ = 3 minute). Prostaglandinele primare sunt eliminate rapid la nivelul pulmonului (la o singură trecere plămânul reţine 95% din PG din sânge). Principalii metaboliţi ai PG sunt derivaţii 15-ceto, rezultaţi prin acţiunea PG-15-hidroxi dehidrogenaza. Prostaciclina este metabolizată la 6-ceto-PGF_1, (Fig. VIII.31). Tromboxanul A_2 este transformat rapid in TXB_2.

VIII.10.3. ACŢIUNILE BIOLOGICE ALE EICOSANOIZILOR

Eicosanoizii au activitaţi biologice multiple care depind nu numai de natura compusului, PGE, PGF, prostaciclină, TX, LT, dar şi de cea a tipului celular, a speciei. Uneori în acelaşi tip de celulă acţiunile exercitate de către unele sau altele dintre prostaglandine sunt opuse (de exemplu contractă sau relaxează musculatura netedă, favorizează sau împiedică agregarea plachetară) şi balanţa dintre cele două efecte determină natura şi amploarea răspunsului.

Prostaglandinele sunt mesageri chimici, sunt hormoni paracrini. Mecanismele ultime prin care se exercită acţiunea lor reglatoare nu sunt complet elucidate. În unele cazuri sunt incriminate variaţii ale concentraţiei nucleotidelor ciclice (AMP_c sau GMP_c),

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

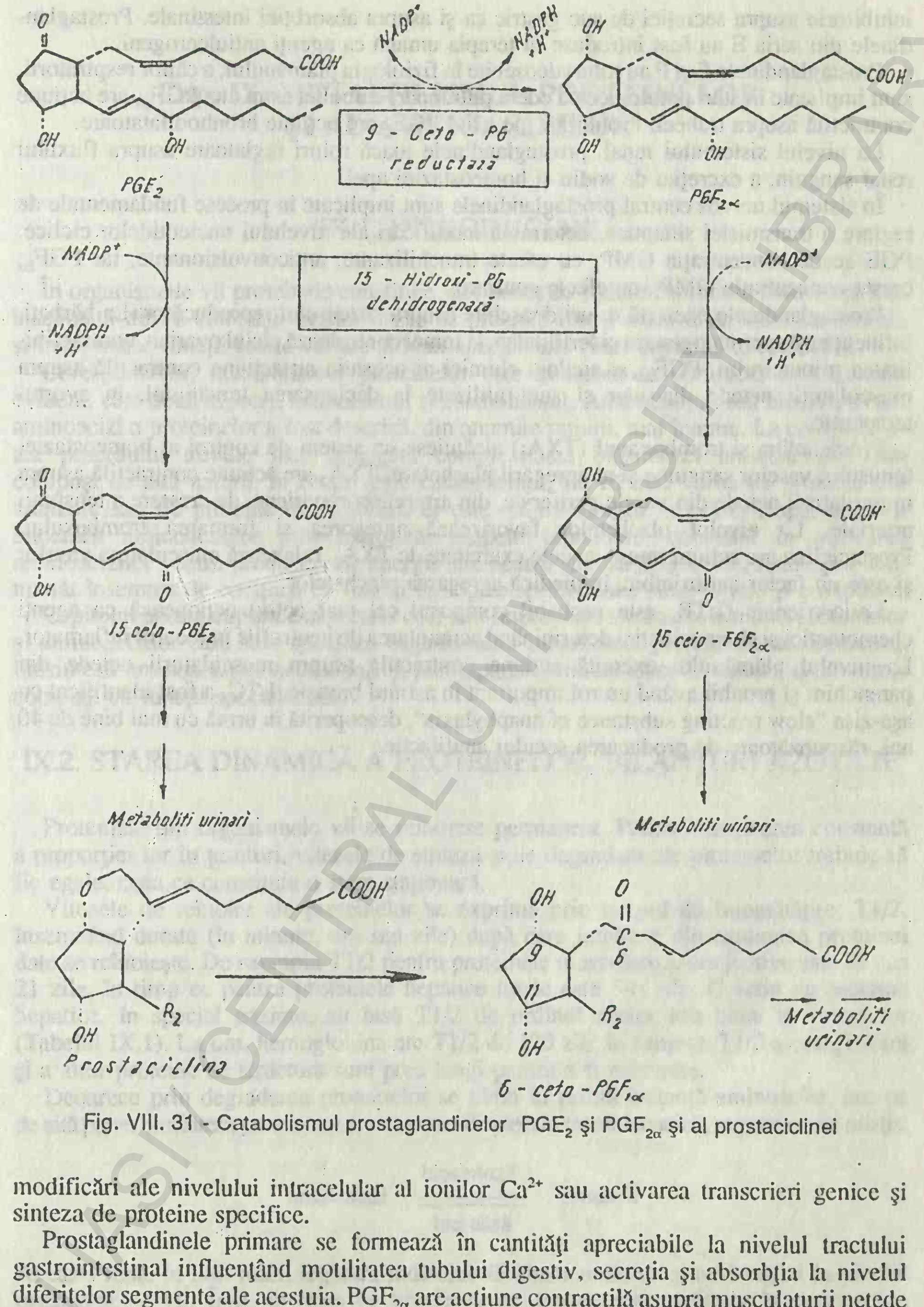


Fig. VIII. 31 - Catabolismul prostaglandinelor PGE_2 şi $PGF_{2\alpha}$ şi al prostaciclinei

modificări ale nivelului intracelular al ionilor Ca^{2+} sau activarea transcrieri genice şi sinteza de proteine specifice.

Prostaglandinele primare se formează în cantităţi apreciabile la nivelul tractului gastrointestinal influenţând motilitatea tubului digestiv, secreţia şi absorbţia la nivelul diferitelor segmente ale acestuia. $PGF_{2\alpha}$ are acţiune contractilă asupra musculaturii netede longitudinale şi circulare. Pe când PGE_2 relaxează musculatura circulară. PGE_2 are acţiune

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

inhibitorie asupra secreţiei de suc gastric ca şi asupra absorbţiei intestinale. Prostaglandinele din seria E au fost introduse în terapia umană ca agenţi antiulcerogeni.

Prostaglandinele E şi F au roluri deosebite în fiziologia plămânului, a căilor respiratorii, sunt implicate în stări patologice ca edem pulmonar, embolie, astm etc. $PGF_{2\alpha}$ are acţiune contractilă asupra traheei, bronhiilor, pe când PGE_2 are acţiune bronhodilatatoare.

La nivelul sistemului renal, prostaglandinele joacă roluri reglatoare asupra fluxului renal sanguin, a excreţiei de sodiu şi homeostaziei apei.

În sistemul nervos central prostaglandinele sunt implicate în procese fundamentale de reglare a transmisiei sinaptice, determină modificări ale nivelului nucleotidelor ciclice. PGE scade concentraţia GMP_c cu efecte tranchilizante, anticonvulsionante, iar $PGF_{2\alpha}$ creşte concentraţia GMP_c, cu efecte contrare.

Prostaglandinele exercită roluri deosebite asupra sistemului reproducător. La bărbaţi, influenţează spermatogeneza şi fertilitatea, la femei controlează ciclul ovarian, contractibilitatea miometrului. $PGF_{2\alpha}$ şi analogi chimici ai acestuia au acţiune contractilă asupra musculaturii netede din uter şi sunt utilizate la declanşarea travaliului, în avortul terapeutic.

Prosticiclina şi tromboxanul (TXA_2) alcătuiesc un sistem de control al homeostaziei tonusului vaselor sanguine şi al agregării plachetare. TXA_2 are acţiune contractilă asupra musculaturii netede din vasele periferice, din arterele coronariene, de creştere a tensiunii arteriale. La nivelul plachetelor favorizează agregarea şi formarea trombusului. Prostaciclina are acţiuni opuse cu cele exercitate de TXA_2, relaxează musculatura vaselor şi este un factor antitrombic, împiedică agregarea plachetelor.

Leucotrienele (LTB_4 este probabil compusul cel mai activ) acţionează ca agenţi chemotactici şi chemocinetici determinând acumularea de neutrofile în focarul inflamator. La nivelul plămânului exercită acţiune contractilă asupra musculaturii netede din parenchim şi bronhii având un rol important în astmul bronşic. LTC_4 a fost identificat cu aşa-zisa “slow reacting substance of anaphylaxis“, descoperită în urmă cu mai bine de 40 ani, răspunzătoare de producerea şocului anafilactic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. IX. METABOLISMUL PROTEINELOR ŞI AL AMINOACIZILOR

IX.1. INTRODUCERE

În organismele vii proteinele constituie, din punct de vedere cantitativ, partea cea mai însemnată dintre compuşii organici. Ele se prezintă într-o mare diversitate structurală şi îndeplinesc funcţii foarte variate şi înalt specializate (vezi capitolul „Proteine“).

Corespunzător, metabolismul proteinelor este deosebit de complex; el cuprinde, evident, cele două aspecte, anabolismul şi catabolismul. Anabolismul, sau biosinteza din aminoacizi a proteinelor a fost descrisă, din anumite raţiuni, mai înainte. La complexitatea procesului trebuie încă adăugată complexitatea biosintezei aminoacizilor din compuşi de altă natură. În ce priveşte catabolismul, fie că este vorba de proteine din alimente sau de proteine din ţesuturi, el este relativ simplu în prima etapă, aceea a eliberării aminoacizilor prin hidroliză. Etapele următoare, constând în utilizarea aminoacizilor pentru producere de energie sau pentru sinteza de glucide, lipide şi a unui număr însemnat de compuşi cu funcţii biologice specializate, sunt variate şi complexe.

Capitolul acesta cuprinde aspectele cele mai importante ale catabolismului proteinelor şi aminoacizilor care sunt specifice organismului uman; sunt prezentate, de asemenea, biosinteza aminoacizilor neesenţiali şi participarea aminoacizilor la sinteza a numeroşi compuşi cu funcţii specializate.

IX.2. STAREA DINAMICĂ A PROTEINELOR. BILANŢURI AZOTATE

Proteinele din organismele vii se reînoiesc permanent. Pentru menţinerea constantă a proporţiei lor în ţesuturi, vitezele de sinteză şi de degradare ale proteinelor trebuie să fie egale, ceea ce constituie o stare staţionară.

Vitezele de reînoire ale proteinelor se exprimă prin timpul de înjumătăţire, T1/2, însemnând durata (în minute, ore sau zile) după care jumătate din cantitatea proteinei date se reînoieşte. De exemplu T1/2 pentru proteinele musculare şi conjuctive este de cca 21 zile, în timp ce pentru proteinele hepatice totale este 5-6 zile. O serie de proteine hepatice, în special enzime, au însă T1/2 de ordinul orelor sau chiar al minutelor (Tabelul IX.1). La om, hemoglobina are T1/2 de 120 zile în timp ce T1/2 a colagenului şi a altor proteine de structură sunt prea lungi pentru a fi măsurate.

Deoarece prin degradarea proteinelor se obţin în primă instanţă aminoacizi, iar, pe de altă parte, biosinteza proteinelor are ca punct de plecare tot aminoacizii, se poate scrie relaţia:

$$\text{aminoacizi} \underset{\text{hidroliză}}{\overset{\text{biosinteză}}{\rightleftharpoons}} \text{proteine}$$

Aceasta redă, în linii mari, legătura indisolubilă dintre proteine şi aminoacizi la nivelul organismelor vii. Însă, în timp ce proteinele se transformă cantitativ în aminoacizi, reutilizarea lor pentru sinteza de proteine noi este numai parţială; cealaltă parte suferă

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul IX.1

T 1/2 al unor enzime din ficat

Enzima	$T_{1/2}$ *(ore)*
Ornitin decarboxilază	*0,2*
δ - aminolevulinat sintetază	*0,3*
ARN polimerază I	*1,3*
Triptofan oxigenază	*2,5*
Serin dehidratază	*4,0*
Glucokinază	*12,0*
Glucozo - 6 fosfat dehidrogenază	*15,0*

degradări cu producere de amoniac, dioxid de carbon şi apă, sau participă la sinteza altor compuşi specializaţi; în locul lor, la sinteză proteinelor sunt utilizaţi aminoacizi proveniţi din proteine alimentare şi prin sinteză endogenă.

Balanţa azotului în organismul uman constă în raportul între cantitatea de azot ingerată sub formă de proteine (sau alţi compuşi cu azot) şi cantitatea de azot excretată prin urină sub formă de amoniac şi uree (care reprezintă cea mai însemnată parte), la care se adaugă azotul excretat prin fecale şi piele. Balanţa este echilibrată dacă aportul exogen compensează pierderile, situaţie întâlnită la adultul normal; ea este negativă dacă N ingerat < N excretat (situaţie întâlnită în inaniţie, boli infecţioase, hemoragii, traumatisme) şi pozitivă dacă N ingerat > N excretat (caracteristică organismelor în creştere, în convalescenţă, la femeia însărcinată).

Cunoaşterea balanţei azotului are mare valoare în stabilirea necesarului zilnic de proteine în hrană. În recomandările care se fac (Tabelul IX.2) trebuie să se ţină seamă şi de tipul de proteine; valoroase sunt, în primul rând, proteinele care conţin aşa numiţii „aminoacizi esenţiali", dar şi ceilalţi aminoacizi naturali în proporţie cât mai apropiată necesarului sintezei de proteine endogene.

Tabelul IX.2

Necesarul de proteine (după recomandările OMS)

Vârsta	*Necesar de proteine în grame / kg corp / zi*
0 - 3 luni	*2,3*
3 - 12 luni	*1 - 2*
1 - 15 ani	*0,7 - 0,9*
15 - 19 ani	*0,65*
ADULT	*0,60*

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX.3. DIGESTIA PROTEINELOR ALIMENTARE ŞI ABSORBŢIA AMINOACIZILOR. HIDROLIZA PROTEINELOR ENDOGENE

Proteinele, asemănător glucidelor şi lipidelor hidrolizabile, nu sunt absorbite la nivelul intestinului. Prin hidroliza totală proteinele eliberează aminoacizi care se absorb. Hidroliza proteinelor alimentare se face sub acţiunea combinată a enzimelor din sucurile gastric, pancreatic şi intestinal. Deşi toate aceste enzime catalizează hidroliza legăturilor peptidice, între ele există diferenţe de specificitate. Se disting endopeptidaze care asigură scindarea numai a legăturilor peptidice din interiorul lanţurilor şi exopeptidaze care scindează numai legăturile peptidice formate de aminoacizii de la capete cu restul macromoleculei proteice sau peptidice. Tabelul IX.3. cuprinde principalele enzime proteolitice digestive.

Tabelul IX.3

Enzimele proteolitice digestive

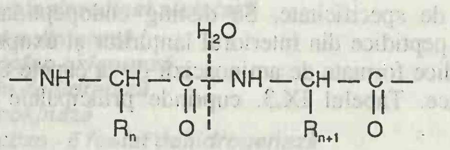
Sucul	*Proenzima*	*Enzima*	*Substratul*	*Produşii*
Sucul gastric (pH 1,5 - 2,5)	*Pepsinogen*	*Pepsină*	*Proteine*	*Polipeptide*
	-	*Gastricsină*	*Proteine*	*Polipeptide*
	Prolabfermentul	*Chimozina (Renina, Labfermentul)*	*Cazeina din lapte*	*Coagulează laptele*
Sucul pancreatic (pH 7,5 - 8,0)	*Tripsinogen*	*Tripsină*	*Polipeptide*	*Peptide*
	Chimotripsinogen	*Chimotripsină*	*Polipeptide*	*Peptide*
	Proelastază	*Elastază*	*Elastina*	*Peptide şi aminoacizi*
	Pro-carboxipeptidaza	*Carboxipeptidaza*	*Proteine, peptide*	*Polipeptide, peptide şi aminoacizi*
Sucul intestinal (pH 6,2 - 7,3)	-	*Aminopeptidaza*	*Peptide*	*Peptide şi aminoacizi*
	-	*Dipeptidaze*	*Dipeptide*	*Aminoacizi*

O caracteristică a majorităţii enzimelor digestive este că sunt secretate de către celulele producătoare în forme inactive, numite proenzime sau zimogeni; explicaţia ţine, pe de o parte, de necesitatea de a intra rapid în acţiune (biosinteza lor necesitând un anumit timp), pe de altă parte, se protejează de acţiunea lor însăşi celulele producătoare şi canalele prin care sunt excretate. Activarea are loc prin detaşarea de la capete sau

BOOKS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

din interior a unor oligopeptide, realizându-se după caz, o demascare a centrului activ sau constituirea acestuia din starea preformată (vezi capitolul „Enzime“).

Pepsinogenul este produs de celulele „principale“ ale mucoasei gastrice. Odată secretat în stomac, pepsinogenul este rapid activat la pepsină în prezenţa ionilor H^+ şi apoi autocatalitic; activarea constă în îndepărtarea unui fragment cuprinzând 42 resturi de aminoacizi de la capătul N-terminal al lanţului polipeptidic unic al pepsinogenului. Secreţia de acid clorhidric este deci la fel de necesară ca şi secreţia pepsinogenului pentru digestia proteinelor în stomac. Pepsina acţionează optim la pH în jur de 2; ea este o endopeptidază care atacă specific legăturile peptidice la care participă, prin grupările aminice, aminoacizii aromatici şi în mică măsură metionina şi leucina:



R_{n+1} = fenilalanină, tirozină, metionină, leucină

Gastricsina, numită şi pepsina C, se formează alături de pepsină prin activarea într-un alt mod a pepsinogenului; pH-ul optim de acţiune al gastricsinei este ceva mai mare decât al pepsinei (aproximativ 3). Gastricsina acţionează predominant la copii întrucât la aceştia sucul gastric are o aciditate ceva mai mică.

Chimozina este prezentă numai în sucul gastric al sugarilor. În prezenţa Ca^{2+} chimozina transformă procazeina în cazeină care este apoi hidrolizată de pepsină.

În stomac, proteinele alimentare sunt mai întâi denaturate (datorită pH-ului foarte scăzut); este favorizată astfel acţiunea hidrolitică specifică a pepsinei şi gastricsinei. Se obţin polipeptide şi oligopeptide, nu însă aminoacizi liberi.

Sucul pancreatic, care este secretat în intestinul subţire, conţine tripsinogen, chimotripsinogen, proelastază şi procarboxipeptidază.

Tripsinogenul este transformat în tripsina prin îndepărtarea, din capătul N-terminal, a unui hexapeptid; procesul are loc sub acţiunea enterokinazei, enzimă secretată de mucoasa intestinală, dar şi autocatalitic. După îndepărtarea hexapeptidului, molecula tripsinei se pliază formându-se centrul activ în care se află His-29, His.-46 şi Ser-183 (Fig. IX.1).

Tripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă, cu gruparea CO, aminoacizii arginină şi lizină.

Chimotripsinogenul este transformat în chimotripsină prin îndepărtarea a două dipeptide, proces care are loc sub acţiunea tripsinei. Din lanţul polipeptidic unic al chimotripsinogenului, ce conţine 245 resturi de aminoacizi, rezultă trei lanţuri mai scurte care menţin, în linii mari, conformaţia zimogenului datorită unor legături disulfurice încrucişate (45-58; 168-182; 191-221). Prin „golurile“ create se permite accesul substratului la centrul activ (Fig. IX.2).

Chimotripsina asigură scindarea legăturilor peptidice la care participă, cu grupările CO, fenilanina, tirozina şi triptofanul.

Elastaza, care asigură hidroliza specifică a unor legături din elastină, se obţine din proelastază sub acţiunea catalitică a tripsinei. Procarboxipeptidaza se transformă în carboxipeptidază, de asemenea, sub acţiunea tripsinei. Carboxipeptidaza asigură scindarea specifică a legăturilor peptidice la care participă cu gruparea NH, aminoacizii C-terminali. Ea este deci o exopeptidază.

Definitivarea hidrolizei se realizează prin acţiunea enzimelor produse la nivelul intestinului subţire; aminopeptidaza (exopeptidază) scindează specific aminoacizii din

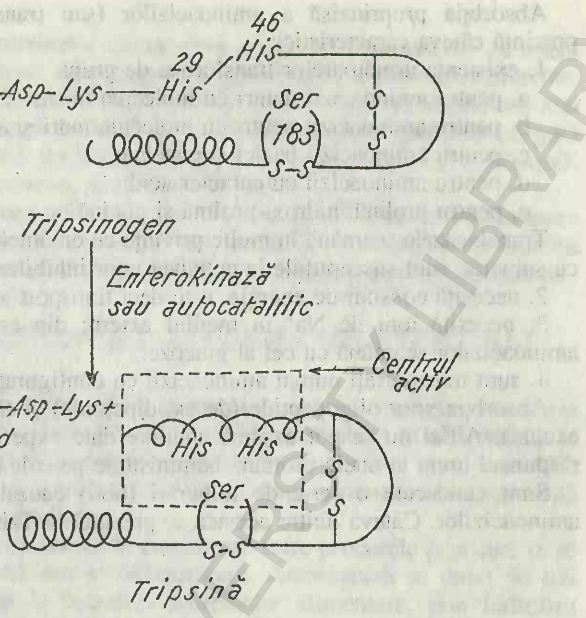


Fig. IX.1 - Ilustrarea transformării tripsinogenului în tripsină cu formarea centrului activ (care cuprinde cele două resturi de histidină şi restul de serină)

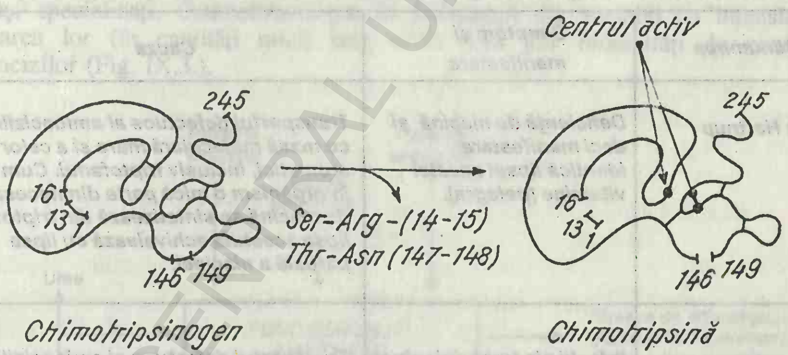


Fig. IX.2 - Formarea chimotripsinei din chimotripsinogen; cele două dipeptide îndepărtate sub acţiunea tripsinei şi chimmotripsinei sunt Ser-Arg (14-15) şi Thr-Asn (147-148)

capetele N-terminale ale peptidelor, iar dipeptidazele (care acţionează chiar la nivelul enterocitelor) asigură ruperea ultimelor legături peptidice.

Absorbţia aminoacizilor are loc la nivelul intestinului subţire; după absorbţie ei sunt preluaţi, în formă liberă, de sângele portal care îi transportă la ficat. Ficatul utilizează o bună parte din aminoacizi pentru sinteza proteinelor proprii şi a proteinelor serice. Restul de aminoacizi este distribuit, prin circulaţia sistemică, la celelalte ţesuturi.

BOOKS - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Absorbţia propriuzisă a aminoacizilor (sau transportul prin epiteliul intestinal) prezintă câteva caracteristici:

1. existenţa următoarelor translocaze de grup:
   a. pentru aminoacizii neutri cu moleculă mică;
   b. pentru aminoacizii neutri cu molecule mari şi aminoacizii aromatici;
   c. pentru aminoacizii bazici şi cisteina;
   d. pentru aminoacizii cu caracter acid;
   e. pentru prolină, hidroxi-prolină şi glicină.

Translocazele seamănă în multe privinţe cu enzimele: prezintă fenomenul de saturare cu substrat, sunt susceptibile la acţiunea unor inhibitori etc.

2. necesită consum de energie, este deci transport activ;
3. necesită ioni de Na^+ în mediul extern; din acest punct de vedere transportul aminoacizilor seamănă cu cel al glucozei;
4. sunt transportaţi numai aminoacizii cu configuraţie L;

Absorbţia unor oligopeptide (de ex. dipeptide) şi chiar a unor proteine nu este total exclusă. Altfel nu se pot explica anumite date experimentale cum ar fi, de exemplu, răspunsul imun la unele proteine administrate pe cale digestivă.

Sunt cunoscute o serie de tulburări (boli) cauzate de dereglări ale transportului aminoacizilor. Câteva dintre acestea se prezintă în Tabelul IX.4.

Tabelul IX.4

Tulburări cauzate de absorbţia defectuoasă a unor aminoacizi

Denumirea	*Simptom şi manifestare*	*Cauza*
Boala Hartnup	*Deficienţă de niacină şi deci manifestare identică lipsei acestei vitamine (pelagra).*	*Transportul defectuos al amioacizilor cu masă moleculară mare şi a celor aromatici, inclusiv triptofanul. Cum în organism o mică parte din necesarul de niacină se sintetizează din triptofan, lipsa acestuia echivalează cu lipsa parţială a niacinei.*
Cistinuria	*Infecţii ale tractului urinar şi pietre la rinichi.*	*Transportul defectuos al amioacizilor bazici, al cisteinei dar şi al cistinei. Defectul de absorbţie este atât la nivel intestinal cât şi la nivel renal. Cistina este foarte solubilă în mediu apos (urină).*
Glicinuria	*Nu se semnalează anormalităţi clinice: eliminare urinară crescută.*	*Absorbţie defectuoasă a prolinei, hidroxiprolinei şi glicinei atât la nivel intestinal cât şi la nivel renal.*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ceea ce priveşte hidroliza proteinelor din ţesuturi, ea are loc continuu dar cu intensităţi diferite. De aici diferenţa mare între timpii de înjumătăţire a diverselor proteine. Enzimele care catalizează această hidroliză se numesc catepsine; s-au identificat mai multe variante de catepsine, notate cu A, B, C, şi D. Toate au acţiune specifică (asigură scindarea numai a anumitor legături peptidice), de ex. cele de tip A, B şi C acţionează, în ordine, asemănător pepsinei, tripsinei şi chimotripsinei.

Hidroliza proteinelor endogene este influenţată de numeroşi factori între care denaturarea şi activarea lizozomilor măresc viteza procesului în toate ţesuturile; hormonii glucocorticoizi măresc viteza în ţesutul muscular, iar insulina reduce viteza în ţesuturile insulinodependente.

IX.4. FONDUL DE AMINOACIZI. AMINOACIZII ESENŢIALI

Cantitatea de aminoacizi liberi existentă la un moment dat în organism constituie fondul de aminoacizi al acelui organism. Pentru că aminoacizi liberi se află practic în toate ţesuturile şi organele precum şi în umori (mai ales în sânge) este greu de stabilit valoarea exactă în fiecare moment a acestei cantităţi. Totuşi noţiunea este importantă pentru raţiuni teoretice şi scopuri didactice.

Dinamica fondului de aminoacizi constă în concurenţa între procesele prin care ei se obţin şi cele prin care se consumă sau se îndepărtează. Aminoacizii se obţin pe trei căi; prin absorbţia celor rezultaţi la hidroliza proteinelor alimentare, prin hidroliza proteinelor endogene şi prin sinteza endogenă. Din fondul comun, fiecare ţesut (celulă) îşi procură tipul şi cantitatea aminoacizilor necesari în momentul dat. Principala utilizare este pentru biosinteza proteinelor; la acest proces participă toţi aminoacizii naturali. Pe de altă parte, diverşi aminoacizi sunt utilizaţi în gluconeogeneză, sinteză de lipide şi compuşi specializaţi. Catabolizarea-proces permanent dar variabil ca intensitate- şi eliminarea lor (în cantităţi mici) prin urină sunt alte modalităţi de consum al aminoacizilor (Fig. IX.3.).

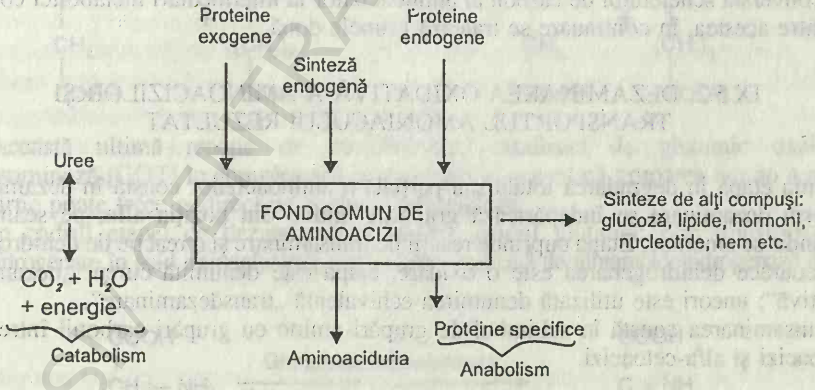


Fig. IX.3 - Constituirea şi utilizarea fondului metabolic comun de aminoacizi

Dacă prin hidroliza proteinelor alimentare şi a celor endogene se furnizează fondului comun toată gama de aminoacizi naturali, sinteza endogenă din compuşi proteici nu este

posibilă decât în cazul unora dintre aceştia. Organismul uman nu este în măsură să sintetizeze scheletul atomilor de carbon al unui număr de nouă aminoacizi; ei se numesc: „aminoacizi esenţiali“ şi se procură în special din alimente: valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, treonina, fenilalalina, triptofanul şi histidina. În perioada de creştere, organismul are nevoie şi de cantităţi mai mari decât poate sintetiza, de arginină; el se numeşte „semiesenţial“.

IX.5. CATABOLISMUL AMINOACIZILOR: DEZAMINAREA OXIDATIVĂ ŞI CICLUL UREOGENETIC

IX.5.1. ASPECTE GENERALE

Prin degradarea completă a aminoacizilor se asigură, ca şi prin degradarea glucidelor şi lipidelor, producere de energie pe seama căreia se sintetizează ATP. La om, contribuţia aminoacizilor (şi deci a proteinelor) la producerea de energie este în medie de 10%, dar în numeroase situaţii (de exemplu inaniţia prelungită) ea poate fi mai însemnată. Este de menţionat că organismul uman nu poate depozita aminoacizii aflaţi în exces; în schimb, aşa cum s-a văzut la metabolismul glucidelor şi lipidelor, organismul uman transformă aminoacizii în glucoză (şi glicogen) precum şi în diverse lipide. Pentru aceasta, diverşii aminoacizi sunt mai întâi degradaţi parţial la compuşi ca acetil-CoA, fumarat, α-cetoglutarat etc.

Degradarea totală şi degradările parţiale constituie la un loc catabolismul aminoacizilor. Diversitatea structurală a acestor compuşi determină şi o mare diversitate a căilor catabolice. Există totuşi şi unele căi care sunt comune tuturor aminoacizilor sau căi comune unor grupuri de aminoacizi. Acestea sunt:

– dezaminarea;
– incorporarea amoniacului în uree în vederea excreţiei din organism;
– conversia scheletului de carbon al aminoacizilor la intermediari metabolici comuni.

Dintre acestea, în continuare se tratează primele două.

IX.5.2. DEZAMINAREA OXIDATIVĂ A AMINOACIZILOR ŞI TRANSPORTUL AMONIACULUI REZULTAT

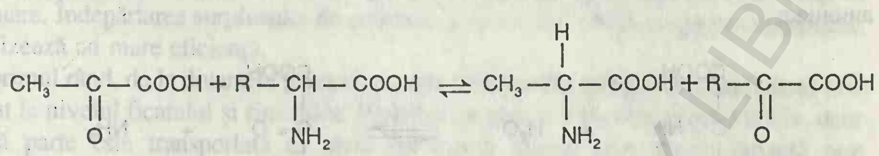
Prima etapă în degradarea totală sau parţială a aminoacizilor constă în dezaminarea lor; prin dezaminare se îndepărtează grupările amino din poziţia alfa, pe seama lor formându-se amoniac. Etapa cuprinde reacţii de transaminare şi o reacţie de dehidrogenare. Deoarece dehidrogenarea este o oxidare, etapa este denumită curent „dezaminare oxidativă“; uneori este utilizată denumirea echivalentă „transdezaminare“.

Transaminarea constă în schimbul de grupări amino cu grupări carbonil între alfa-aminoacizi şi alfa-cetoacizi.

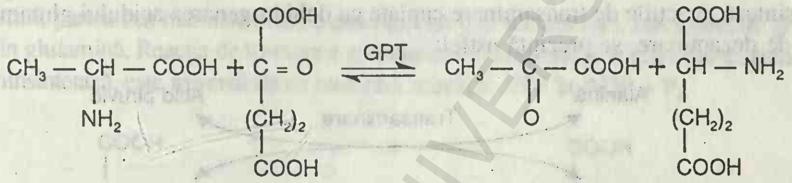
$$R_1-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + R_2-\underset{\displaystyle O}{\underset{||}{C}}-COOH \rightleftharpoons R_1-\underset{\displaystyle O}{\underset{||}{C}}-COOH + R_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

Reacţiile de transaminare sunt total reversibile; coenzima transaminazelor (aminotransferazelor) este piridoxalfosfatul. Alte date privind transaminazele, inclusiv mecanismul reacţiilor de transaminare sunt prezentate în capitolul „Vitamine şi coenzime“.

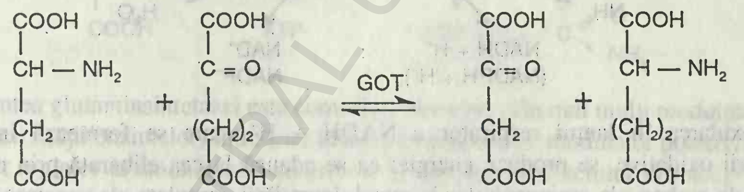
În organismul uman, reacţii de transaminare au loc în toate ţesuturile dar mai intens în ficat, rinichi, inimă, plămâni, creier. Varietatea lor este mare dacă avem în vedere că fiecare dintre cetoacizii piruvic, oxaloacetic şi α-cetoglutaric reacţionează cu aproape toţi aminoacizii naturali (mai puţin prolina, treonina şi lizina) şi cu încă unii care nu sunt naturali. Deosebit de importante pentru etapa de dezaminare oxidativă sunt transaminările notate 1, 2 şi 3:

1)


Reacţiile acestea ale acidului piruvic cu diverşi aminoacizi (cei menţionaţi mai înainte) sunt catalizate de enzimele numite alanină-piruvat transaminaze; rezultatul lor este că grupările amino de pe diverşi aminoacizi se colectează în alanină.

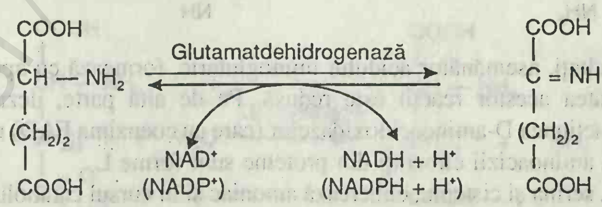
2)


Prin această reacţie, catalizată de glumatic piruvic transaminază (GPT), corelată cu reacţiile de la punctul anterior, toate grupările amino sunt colectate în acidul glutamic.

3)


Această ultimă reacţie de transaminare, catalizată de glutamic oxaloacetic transaminază (GOT) le completează pe celelalte în sensul că gruparea amino a acidului aspartic poate trece şi direct pe acidul α-cetoglutaric.

În cadrul etapei de dezaminare oxidativă, acidul glutamic este transformat prin dehidrogenare în acid iminoglutaric; reacţia este catalizată de glutamatdehidrogenază (GlDH).



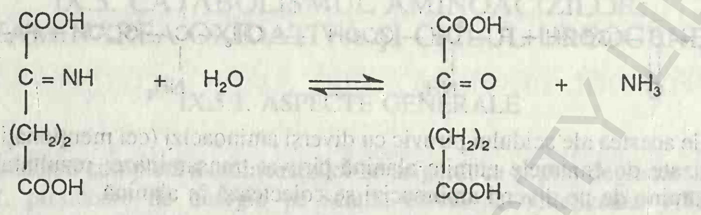
În legătură cu această reacţie reversibilă se remarcă faptul că în calitate de coenzimă poate funcţiona atât NAD^+ cât şi $NADP^+$. Mai precis, în procesul de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

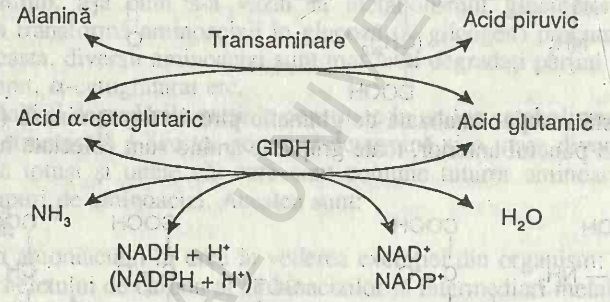
dezaminare oxidativă coenzima este NAD^+ în timp ce în procesul invers, de biosinteză a aminoacizilor, coenzima este $NADPH + H^+$ (se va vedea la biosinteza aminoacizilor).

Activitatea glutamatdehidrogenazei este controlată prin efectori alosterici: activatori sunt GDP şi ADP iar inhibitori sunt GTP şi ATP. Deci scăderea resurselor de energie ale celulei accelerează degradarea aminoacizilor.

Acidul iminoglutaric reacţionează spontan cu apa formându-se acid α-cetoglutaric şi amoniac:



În sinteză, reacţiile de transaminare cuplate cu dehidrogenarea acidului glutamic, deci etapa de dezaminare, se prezintă astfel:



Prin oxidarea în lanţul respirator a $NADH + H^+$, care se formează în cursul dezaminării oxidative, se produce energie; ea se adaugă la cea eliberată prin oxidarea catenelor de carbon ale aminoacizilor în cazul degradării complete ale acestora.

În organism, în special în ficat şi în rinichi, se produce şi o dezaminare directă a aminoacizilor. Există aici D-aminoacidoxidaze şi L-aminoacidoxidaze, ultimele având coenzima FMN şi acţionând conform reacţiei:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + FMN \longrightarrow R-\underset{\displaystyle NH}{\underset{||}{C}}-COOH + FMNH_2$$

Iminoacizii rezultaţi, asemănător acidului iminoglutaric, formează cu apa amoniac şi cetoacizi. Intensitatea acestor reacţii este redusă. Pe de altă parte, dezaminările D-aminoacizilor sub acţiunea D-aminoacidoxidazelor (care au coenzima FAD) nu au valoare şi pentru faptul că aminoacizii eliberaţi din proteine sunt forme L.

Doi aminoacizi, serina şi cisteina, eliberează amoniac şi în cursul catabolizării lor spre acid piruvic (vezi „utilizarea scheletului de atomi de carbon al aminoacizilor").

În organismul uman, pe căile arătate dar mai ales prin dezaminarea oxidativă, se

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

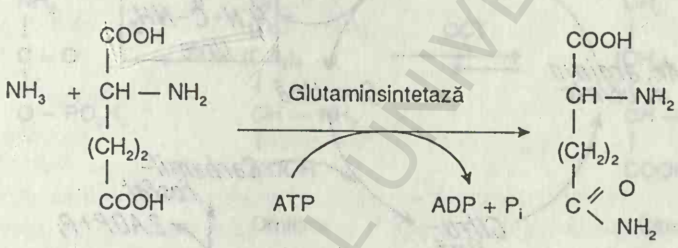
formează cea mai mare parte a amoniacului. Prin oxidarea aminelor, hidroliza ureei prezentă în secreţiile tubului digestiv cât şi prin degradarea sub acţiunea florei microbiene a resturilor de proteine din intestin rezultă cantităţi suplimentare de amoniac.

Amoniacul este dăunător organismului, creierul resimţindu-se în primul rând; pentru a preveni efectul nociv, acest compus trebuie rapid utilizat sau îndepărtat.

Singura utilizare este pentru sinteza de aminoacizi neesenţiali, aşa cum va reieşi în continuare. Îndepărtarea surplusului de amoniac, deşi are loc printr-un proces complicat, se realizează cu mare eficienţă.

În primul rând, de la diversele ţesuturi sau alte locuri unde este produs, amoniacul este colectat la nivelul ficatului şi rinichilor. Probabil tot pentru a preveni efectul nociv, doar o mică parte este transportată ca atare (în formă liberă) prin sânge; dovadă este concentraţia plasmatică foarte redusă (10-20 µg/100 ml plasmă). Acest amoniac este preluat de ficat. La ficat ajunge prin sistemul port şi amoniacul produs în intestin din resturi de proteine. Tot acest amoniac extern se adaugă la cantitatea foarte mare de amoniac produsă de către ficat.

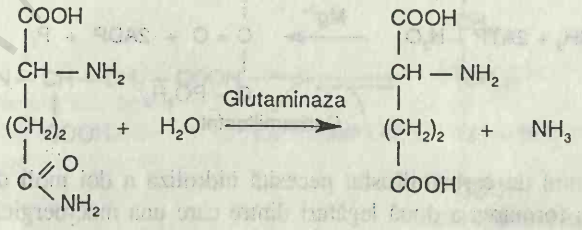
În ţesuturi, partea cea mai însemnată a amoniacului este încorporată, sub formă de grupări amidice, în glutamină. Reacţia de formare a glutaminei din amoniac şi acid glutamic, catalizată de glutaminsintetază, este ireversibilă ca urmare a scindării ATP în ADP + P_i:



Activitatea glutaminsintetazei este controlată alosteric prin mai mulţi modulatori (vezi reglarea activităţii enzimelor) între care însuşi amoniacul este modulator pozitiv; evident, acest efect reglator al amoniacului contribuie la diminuarea efectului său nociv.

Glutamina, aminoacid fără acţiune dăunătoare, este preluată de sânge de unde este extrasă apoi în principal de rinichi care dispun de enzima glutaminază. În sânge concentraţia glutaminei este de 3-5 ori mai mare decât a altor aminoacizi ceea ce reflectă nu numai rolul acestui aminoacid în transportul amoniacului dar şi necesitatea pentru diferite biosinteze (de exemplu a nucleotidelor).

Reacţia catalizată de glutaminază, la rândul ei ireversibilă, este:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În rinichi, amoniacul format din glutamină se adaugă celui produs aici prin dezaminarea oxidativă sau pe alte căi. El difuzează prin membrana zonei tubulare şi acceptând protoni, dă naştere ionului amoniu care apare în urină. Eliminarea sub această formă a unei părţi a amoniacului prezintă importanţă şi în legătură cu menţinerea rezervei alcaline a plasmei.

Amoniacul produs şi colectat de ficat, care reprezintă la un loc de 8-9 ori mai mult decât cel renal, este transformat tot aici în uree, compus foarte solubil în mediu apos şi fără efect dăunător; ureea va fi preluată de sânge şi eliminată prin urină.

IX.5.3. BIOSINTEZA UREEI

Formarea ureei are loc în cadrul unei secvenţe ciclice de reacţii cunoscută şi sub numele de ciclul ureogenetic sau ciclul Krebs-Henseleit; unele dintre reacţiile ciclului se desfăşoară în mitocondriile hepatocitelor, altele în citosol (Fig. IX.4).

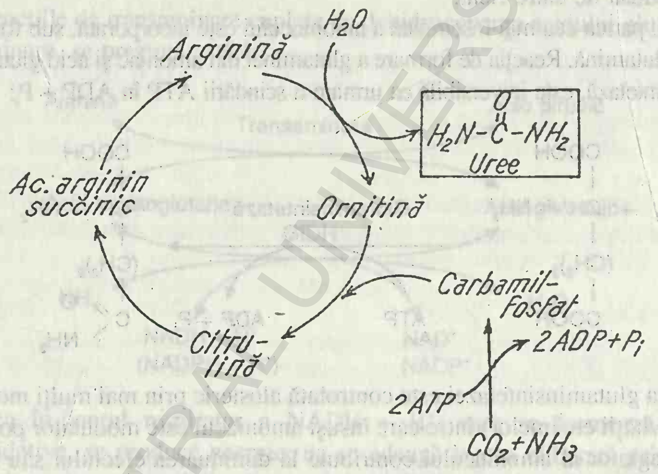


Fig. IX.4 - Schema generală a ciclului ureogenetic

Ciclul ureogenetic debutează prin condensarea, în interiorul mitocondriilor, a amoniacului cu CO_2 şi ATP: reacţia este catalizată de carbamilfosfatsintetaza mitocondrială:

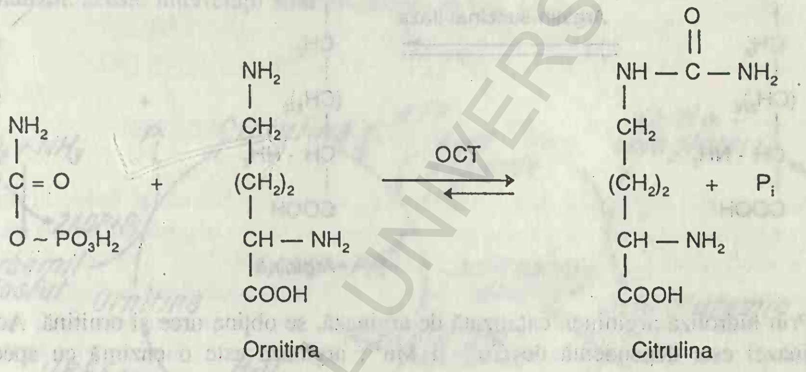
$$CO_2 + NH_3 + 2ATP + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}} \underset{\text{Carbamilfosfat}}{\begin{matrix} NH_2 \\ | \\ C=O \\ | \\ O\sim PO_3H_2 \end{matrix}} + 2ADP + P_i$$

Sinteza unui mol de carbamilfosfat necesită hidroliza a doi moli de ATP; energia liberă serveşte la formarea a două legături dintre care una macroergică. Este necesară şi prezenţa ionilor de Mg^{2+}.

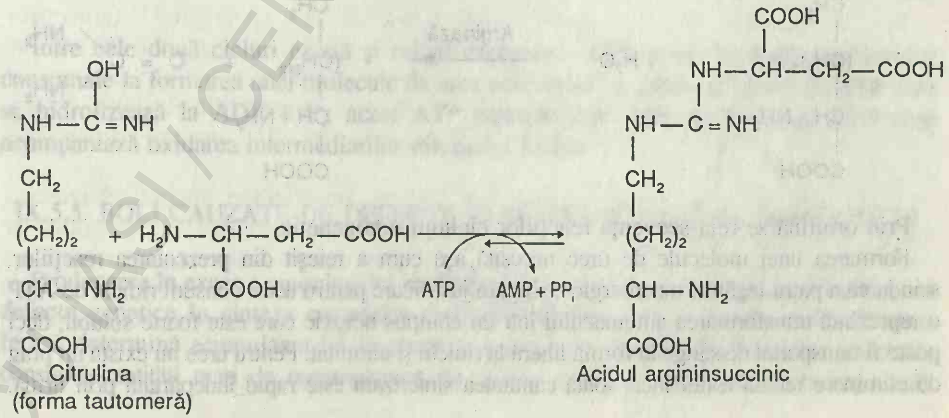
Pentru că există şi o carbamilfosfatsintetază citosolică, care asigură formarea carbamilfosfatului necesar sintezei nucleotidelor primidinice (vezi metabolismul compuşilor purinici şi pirimidinici), precizarea „mitocondrială" sau „citosolică" este absolut necesară.

Carbamilfosfatsintetaza mitocondrială este o enzimă alosterică a cărei activitate este modulată pozitiv de un derivat al acidului glutamic, N-acetilglutamatul; el produce o modificare conformaţională profundă a enzimei mărindu-i afinitatea pentru ATP. Activitatea N-acetil-glutamatsintetazei, enzima ce catalizează sinteza N-acetilglutamatului, este crescută de mai mulţi aminoacizi, mai ales arginina.

Tot la nivelul mitocondriei are loc transferul grupării carbamil de pe carbamilfosfat pe ornitină; în această reacţie, catalizată de ornitin-carbamiltransferază (OCT), numită şi ornitintranscarbamilaza, se formează citrulina. Enzima OCT este prezentă şi în sânge unde activitatea ei se dozează fiind utilă în investigarea ficatului (deoarece provine numai de la acest organ):

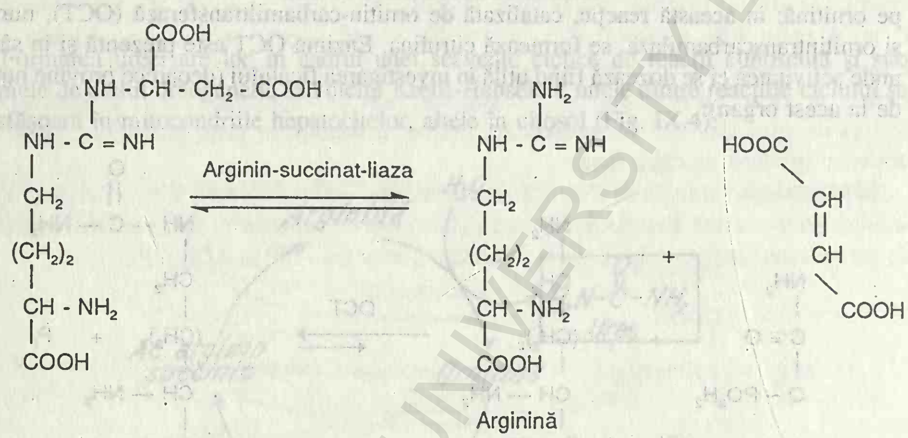


În citosol, unde ajunge prin simplă difuziune, citrulina se condensează cu acidul aspartic în prezenţa arginin-succinatsintetazei; se formează acidul argininsuccinic. Reacţia e posibilă numai cu participarea ATP care se scindează în AMP şi PP_i (deci sunt utilizate ambele legături macroergice):

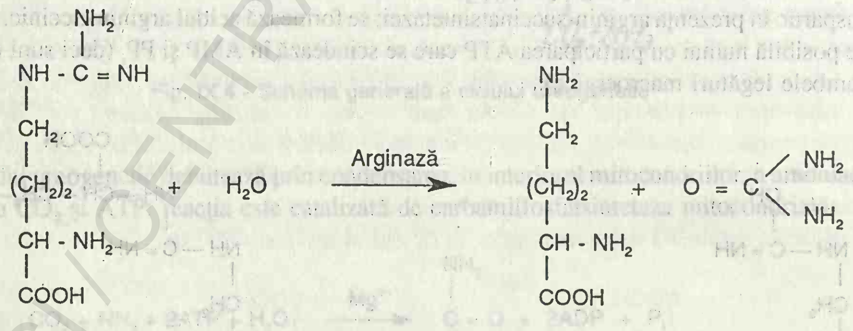


Reacţia aceasta împreună cu cele două reacţii care au loc în continuare evidenţiază că acidul aspartic este furnizorul celei de a doua grupări aminice pentru sinteza ureei (prima provenind din NH_3).

Următoarea reacţie, reversibilă, a ciclului ureogenetic constă în scindarea acidului arginin-succinic în arginină şi acid fumaric; enzima, argininsuccinatliaza, prin specificitatea stereochimică, exclude formarea acidului maleic (izomerul acidului fumaric). Acidul fumaric este intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici. Intrând în acest ciclu, acidul fumaric este transformat în acid oxaloacetic, care prin transaminare regenerează acidul aspartic şi astfel este susţinută sinteza ureei.



Prin hidroliza argininei, catalizată de arginază, se obţine uree şi ornitină. Activitatea arginazei este dependentă de Co^{2+} şi Mn^{2+}; arginaza este o enzimă cu specificitate absolută.



Prin ornitină se reia secvenţa reacţiilor ciclului ureogenetic.

Formarea unei molecule de uree necesită, aşa cum a reieşit din prezentarea reacţiilor, scindarea a patru legături macroergice; singura justificare pentru acest consum ridicat de ATP o reprezintă transformarea amoniacului într-un compus netoxic care este foarte solubil, deci poate fi transportat de sânge în formă liberă la rinichi şi eliminat. Pentru uree nu există un prag de eliminare renală astfel încât toată cantitatea sintetizată este rapid îndepărtată prin urină.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Valoarea uremiei (la adult 20-40 mg/100 ml plasmă) şi în special cantitatea de uree excretată zilnic prin urină (15-30 g/24 ore) reflectă deosebita intensitate cu care se desfăşoară ciclul ureogenetic, pe plan mai general intensitatea catabolismului proteic.

IX.5.4. RELAŢII ÎNTRE CICLUL UREOGENETIC ŞI CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI

Între ciclul ureogenetic şi ciclul acizilor tricarboxilici există o strânsă legătură; relaţia prin intermediul acidului fumaric (cu regenerarea acidului aspartic) s-a menţionat ceva mai înainte. Pe de altă parte, oxidarea în acidul Krebs a α-cetoglutaratului favorizează deplasarea în sensul formării amoniacului a echilibrului reacţiei catalizate de glutamatdehidrogenază şi, prin cuplare cu lanţul respirator, formarea unei cantităţi crescute de ATP. La disponibilitatea de amoniac şi ATP astfel create se adaugă efectul de activare a carbamilfosfatsintetazei de către ATP (prin intermediul acetilglutamatului), toate convergând spre o sinteză crescută a ureei.

Schematizat, aceste interrelaţii sunt prezentate în Fig. IX.5.

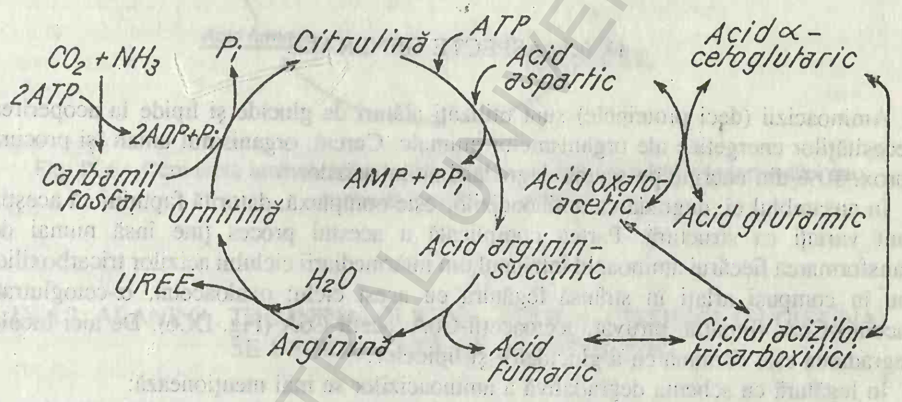


Fig. IX.5 - Interrelaţiile dintre ciclul ureogenetic şi ciclul acizilor tricarboxilici

Între cele două cicluri există şi relaţii energetice. Cele patru legături macroergice consumate la formarea unei molecule de uree echivalează cu patru molecule de ATP care se hidrolizează la ADP + P_i; acest ATP este obiţinut prin fosforilarea ADP care acompaniază oxidarea intermediarilor din ciclul Krebs.

IX.5.5. BOLI CAUZATE DE DEFECTE ÎN METABOLIZAREA AMONIACULUI

Producerea în exces a amoniacului sau îndepărtarea insuficient de rapidă datorită unor defecte genetice în sinteza enzimelor carbamilfosfatsintetază şi ornitin-carbamiltransferază determină acumularea lui în sânge şi ţesuturi, cu multiple consecinţe: ţesuturile consumă cantităţi mari de α-cetoglutarat (în reacţia catalizată de glutamatdehidrogenază),

intensitatea ciclului Krebs diminuă, deci scade producerea de ATP. S-a mai arătat în ultima vreme că, cel puţin în creier, pentru glutaminsintetază amoniacul este nu numai substrat ci şi modulator pozitiv. Cum reacţia catalizată de glutaminsintetaza necesită ATP, consumul acestuia va creşte corespunzător; creierul resimte rapid deficitul de ATP de aceea în hiperamonemii alături de stări vomitive, ataxie, iritabilitate, letargie, se semnalizează întârzierea dezvoltării mintale ca urmare a unor leziuni pe creier. Se pot aduce unele ameliorări printr-un regim alimentar sărac în proteine şi prin adaosul la hrană a unor α-cetoacizi; ei vor incorpora amoniacul în aminoacizii utilizabili pentru biosinteza proteinelor şi deci concentraţia acestuia în sânge va scădea.

Şi în sinteza celorlalte enzime ale ciclului ureogenetic pot exista defecte; bolile cauzate sunt numite citrulinuria (defect arginin-succinatsintetaza), arginino-succinic acidemia (defect arginin-succinat-liaza), hiperargininemia (defect arginaza).

Copiii cărora le lipseşte total oricare dintre enzimele ciclului ureogenetic nu supravieţuiesc perioadei neonatale.

IX.6. CATABOLISMUL AMINOACIZILOR: UTILIZAREA SCHELETELOR DE CARBON

IX.6.1. ASPECTE GENERALE

Aminoacizii (deci proteinele) sunt utilizaţi alături de glucide şi lipide la acoperirea necesităţilor energetice ale organismelor animale. Curent, organismul uman îşi procură aprox. 10% din energie pe seama degradării aminoacizilor.

În ansamblul ei, degradarea aminoacizilor este complexă, datorită faptului că aceştia sunt variaţi ca structură. Partea complicată a acestui proces ţine însă numai de transformarea fiecărui aminoacid într-unul din intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici sau în compuşi aflaţi în strânsă legătură cu acest ciclu: oxaloacetat, α-cetoglutrat, succinil-CoA, fumarat, piruvat, acetoacetil-CoA, acetil-CoA (Fig. IX.6). De aici încolo degradarea este comună cu a glucidelor şi lipidelor.

În legătură cu schema degradativă a aminoacizilor se mai menţionează:

a) unii au câte două căi de transformare în intermediarii menţionaţi: tirozina şi fenilalanina la acetoacetil-CoA şi fumarat, izoleucina la succinil-CoA şi acetil-CoA;

b) intermediarii la care sunt degradaţi servesc şi pentru sinteza de glucide (gluconeogenaza) sau pentru sinteza de lipide. Se numesc aminoacizi glucogenici cei care se degradează la oxaloacetat, α-cetoglutarat, succinil-CoA, fumarat şi piruvat; aminoacizii care se degradează la acetoacetil-CoA şi acetil-CoA sunt cetogeni (din ei, alături de alte lipide, se sintetizează corpii cetonici). Cei doi aminoacizi de la punctul a) sunt atât glucogeni cât şi cetogeni.

Toate transformările aminoacizilor spre diverşi intermediari includ obligatoriu transaminări şi dezaminări. Dacă pentru unii simpla transaminare sau hidroliză şi transaminare conduce direct la intermediari, pentru alţii sunt necesare şi alte reacţii.

Este de reţinut că majoritatea reacţiilor căilor degradative sunt reversibile (chiar dacă la scrierea lor se omite punerea semnului reversibilităţii). Aceasta prezintă importanţă în sensul că sunt utilizate şi în biosinteza aminoacizilor.

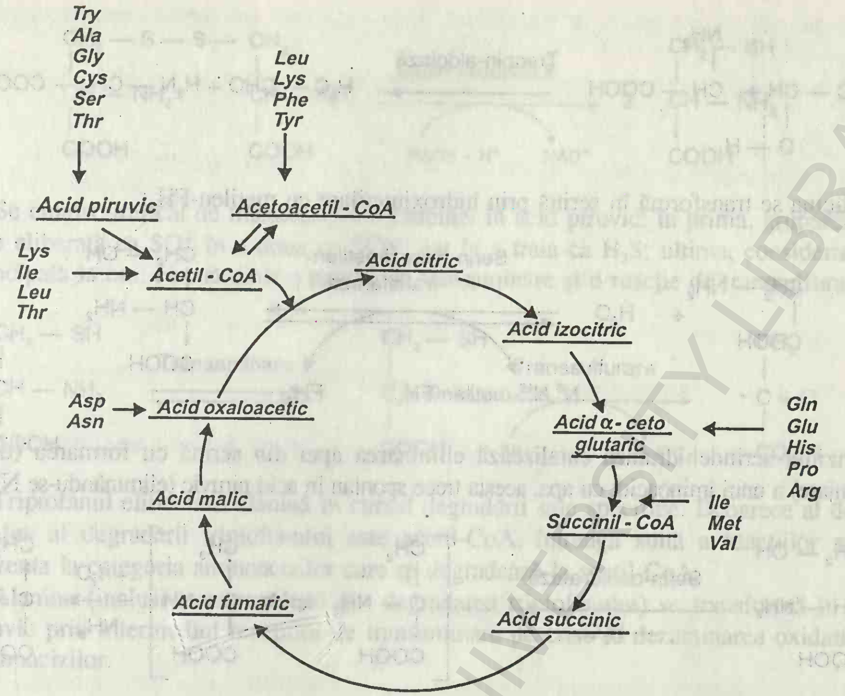
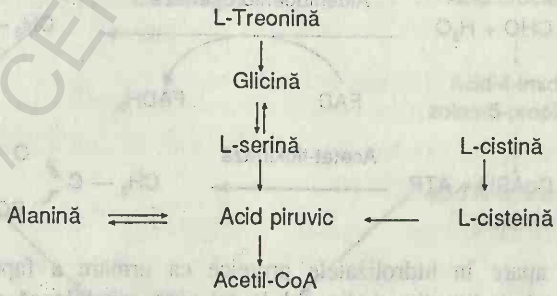


Fig. IX.6 - Conversia aminoacizilor la intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici sau compuşi înrudiţi cu aceştia

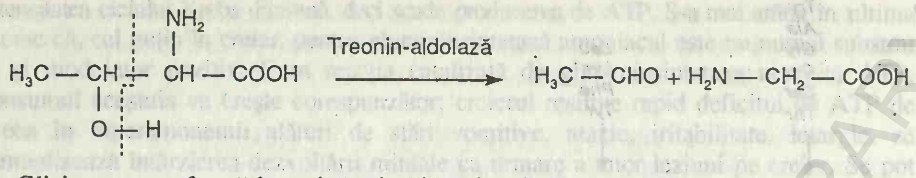
IX.6.2. ALANINA, TREONINA, GLICINA, SERINA, CISTEINA (ŞI CISTINA) SE DEGRADEAZĂ LA ACID PIRUVIC

Aceste transformări sunt cuprinse în schema generală:

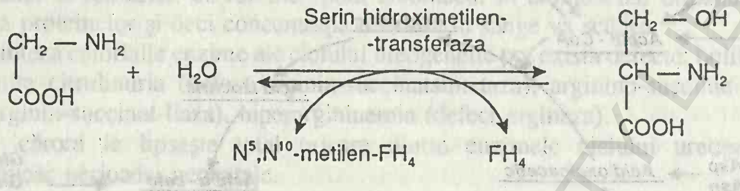


Treonina formează glicina prin scindarea catalizată de treonin-aldolază:

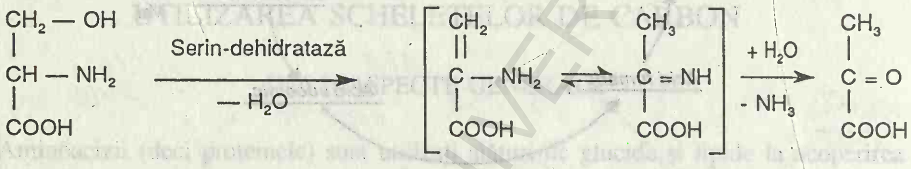
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Glicina se transformă în serină prin hidroximetilare cu metilen-FH_4:

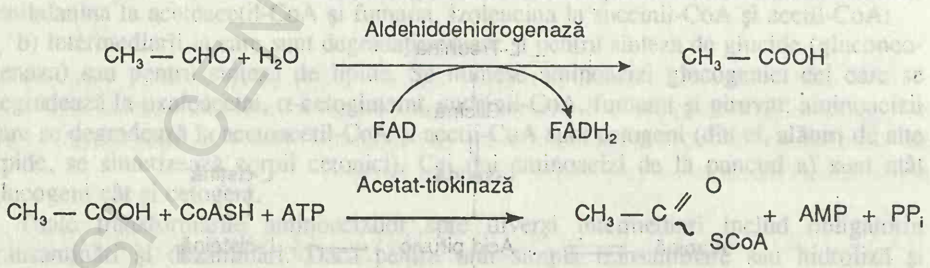


Enzima serindehidrataza catalizează eliminarea apei din serină cu formarea (după rearanjare) a unui iminoacid; cu apa, acesta trece spontan în acid piruvic (eliminându-se NH_3):



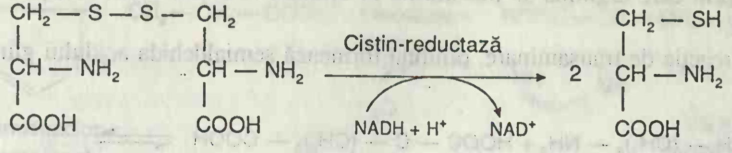
În ficat, sub acţiunea unui sistem enzimatic complex (asemănător complexului piruvatdehidrogenazei), glicina cedează metilenul acidului tetrahidrofolic (eliminând CO_2 şi NH_3). Având în vedere schema de mai sus cât şi reversibilitatea totală a reacţiei catalizată de serinhidroximetilentransferaza, în ficat serina şi treonina alături de glicină sunt transformate prioritar în CO_2 şi NH_3 fiind furnizorii principali de metilen pentru acidul tetrahidrofolic.

Revenind la acetaldehidă, formată alături de glicină la scindarea treoninei sub acţiunea treonin-aldolazei, aceasta, prin oxidare la acid acetic şi reacţia celui din urmă cu CoA conduce la formarea acetil-CoA:

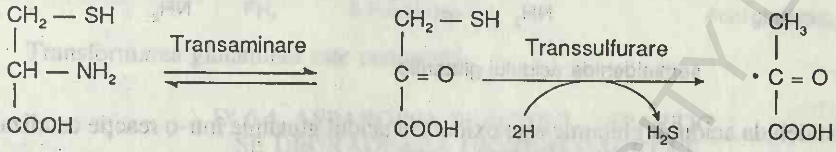


Cistina, care apare în hidrolizatele proteice ca urmare a faptului că enzimele proteolitice din tubul digestiv şi din celule nu sunt capabile să scindeze legăturile disulfurice, este transformată în cisteină printr-o reacţie de reducere catalizată de cistinreductază:

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Se cunosc trei căi de transformare a cisteinei în acid piruvic: în prima, gruparea SH este eliberată ca SO_3^{2-}, în a doua ca SCN^-, iar în a treia ca H_2S; ultima, considerată ca principală la om, constă dintr-o reacţie de transaminare şi o reacţie de transsulfurare:

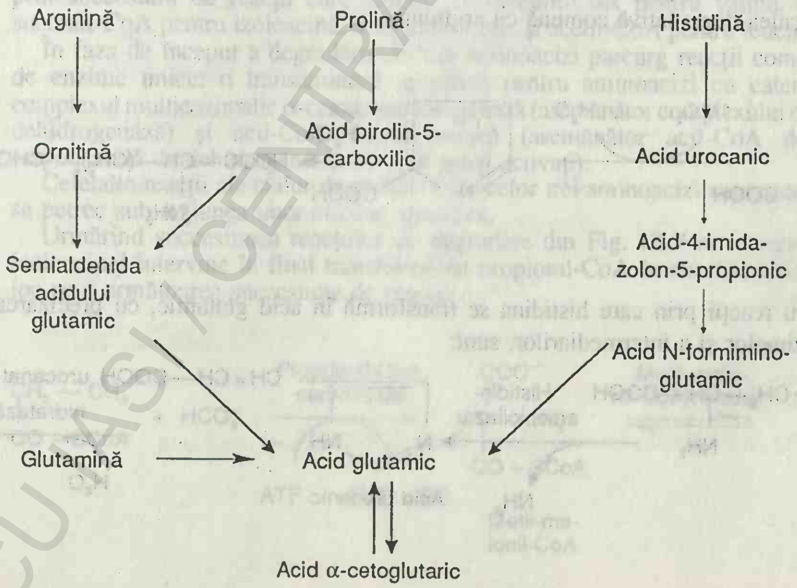


Triptofanul eliberează alanină în cursul degradării sale specifice. Deoarece al doilea produs al degradării triptofanului este acetil-CoA, întreaga suită a reacţiilor se va prezenta la categoria aminoacizilor care se degradează la acetil-CoA.

Alanina (inclusiv cea rezultată din degradarea triptofanului) se transformă în acid piruvic prin intermediul reacţiilor de transaminare descrise la dezaminarea oxidativă a aminoacizilor.

IX.6.3. ARGININA, PROLINA, HISTIDINA, GLUTAMINA ŞI ACIDUL GLUTAMIC SE DEGRADEAZĂ LA ACID α-CETOGLUTARIC

Aceste transformări au loc după schema generală:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacţia prin care arginina se transformă în ornitină este una dintre reacţiile ciclului ureogenetic.

Printr-o reacţie de transaminare, ornitina formează semialdehida acidului glutamic:

$$HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_3-NH_2+HOOC-\underset{O}{\underset{\|}{C}}-(CH_2)_2-COOH \rightleftharpoons$$

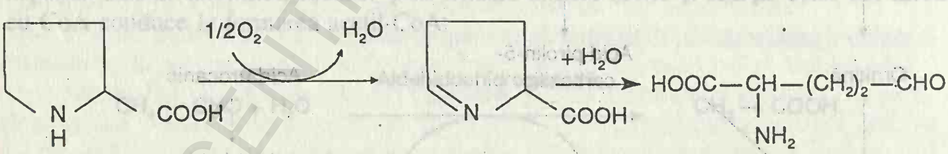
$$\rightleftharpoons \underbrace{HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_2-CHO}_{\text{semialdehida acidului glutamic}}+HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_2-COOH$$

Semialdehida acidului glutamic este oxidată la acidul glutamic într-o reacţie catalizată de o dehidrogenază cu coenzima NAD^+:

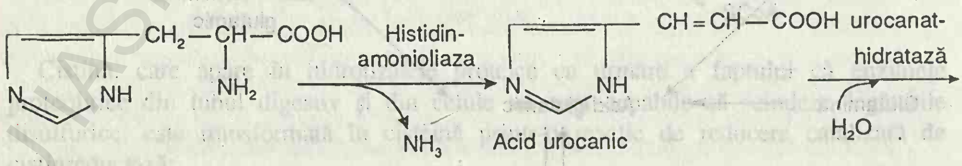
$$HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_2-CHO \xrightarrow[NAD^+ \;\to\; NADH+H^+]{H_2O} HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_2-COOH$$

Transformarea acidului glutamic în acid α-cetoglutaric este cunoscută (vezi dezaminarea oxidativă a aminoacizilor):

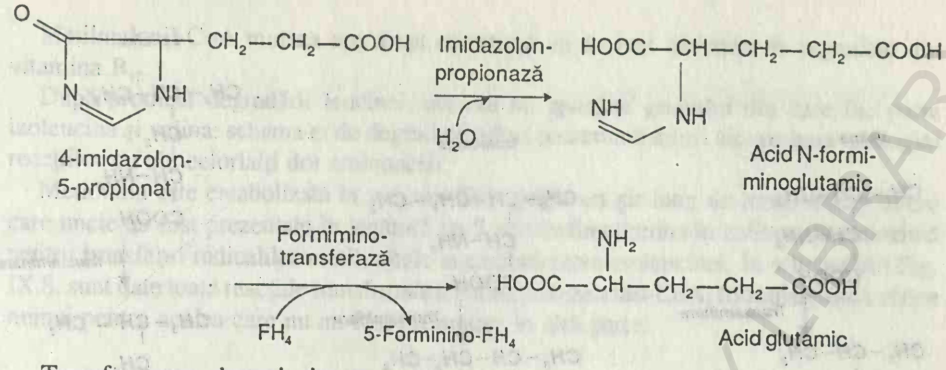
Printr-o reacţie de oxidare (catalizată de prolinoxidază), urmată de o reacţie spontană de desfacere a ciclului, prolina se transformă în semialdehida acidului glutamic; de aici se urmează calea degradativă comună cu arginina:



Cele patru reacţii prin care histidina se transformă în acid glutamic, cu precizarea numelor enzimelor şi a intermediarilor, sunt:



BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Transformarea glutaminei este cunoscută.

IX.6.4. ASPARGINA ŞI ACIDUL ASPARTIC SE DEGRADEAZĂ LA OXALOACETAT

Aspargina se hidrolizează la acid aspartic într-o reacţie cetalizată de asparginază:

$$H_2NOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow[-NH_3]{+H_2O} HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

Acidul aspartic este transformat în acid oxaloacetic în reacţia catalizată de GOT (vezi dezaminarea oxidativă a aminoacizilor).

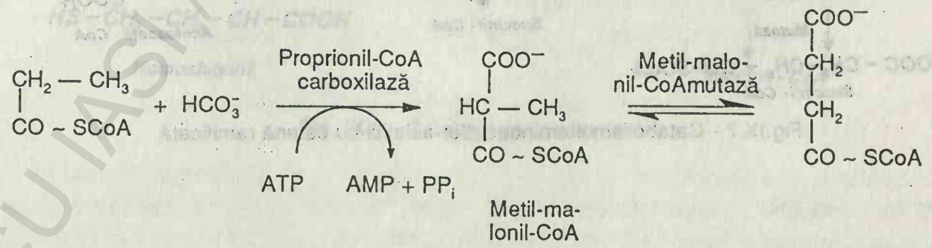
IX.6.5. IZOLEUCINA, VALINA ŞI METIONINA SE DEGRADEAZĂ LA SUCCINIL-CoA

Aminoacizii alifatici cu catenă ramificată valina, izoleucina şi leucina se degradează prin succesiuni de reacţii care conduc la succinil-CoA pentru valină, acetil-CoA şi succinil-CoA pentru izoleucină, acid acetoacetic şi acetil-CoA pentru leucină (Fig. IX.7).

În faza de început a degradării cei trei aminoacizi parcurg reacţii comune catalizate de enzime unice: o transaminază specifică pentru aminoacizi cu catena ramificată, complexul multienzimatic α-cetoacidehidrogenază (asemănător complexului α-cetoglutarat-dehidrogenază) şi acil-CoA dehidrogenază (asemănător acil-CoA dehidrogenazei responsabilă de dehidrogenarea acizilor graşi activaţi).

Celelalte reacţii ale căilor degradative ale celor trei aminoacizi sunt asemănătoare dar se petrec sub acţiunea unor enzime specifice.

Urmărind succesiunea reacţiilor de degradare din Fig. IX.7 se observă că în cazul izoleucinei intervine în final transformarea propionil-CoA în succinil-CoA; aceasta are loc prin următoarea succesiune de reacţii:



B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

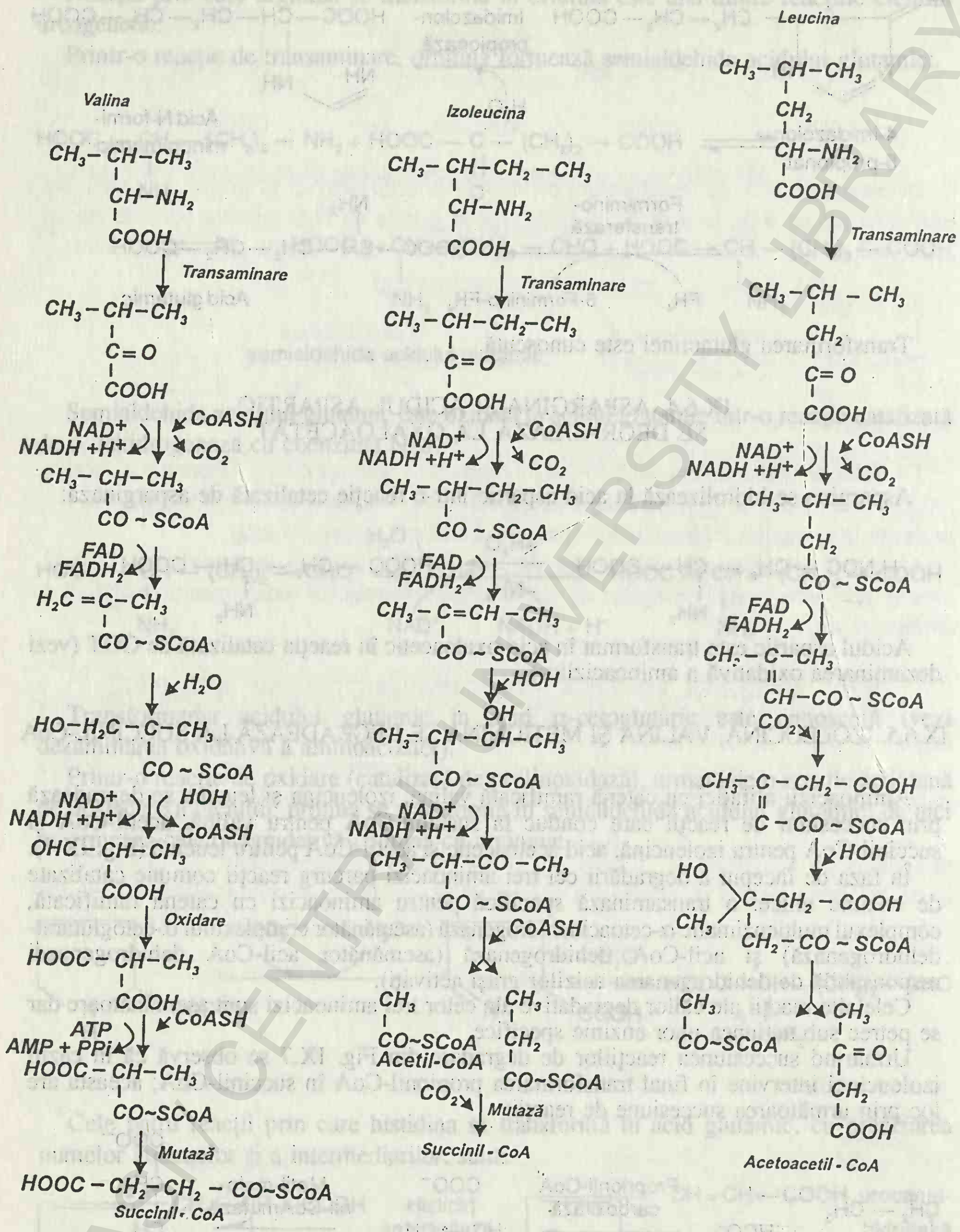


Fig.IX.7 - Catabolismul aminoacizilor alifatici cu catenă ramificată

Metilmalonil-CoA mutaza are drept coenzimă un derivat sintetizat în organism din vitamina B_{12}.

După produşii degradării leucinei, aceasta nu aparţine grupului din care fac parte izoleucina şi valina; schema ei de degradare a fost prezentată totuşi aici pe baza analogiei reacţiilor cu ale celorlalţi doi aminoacizi.

Metionina este catabolizată la succinil-CoA printr-un şir lung de transformări dintre care unele au fost prezentate în legătură cu S-adenozilmetionina în calitate de coenzimă pentru transferul radicalilor metil, altele la catabolizarea izoleucinei. În schema din Fig. IX.8. sunt date toate reacţiile transformării metionină-succinil-CoA, formulele fiind scrise numai pentru acelea care nu au fost prezentate în altă parte.

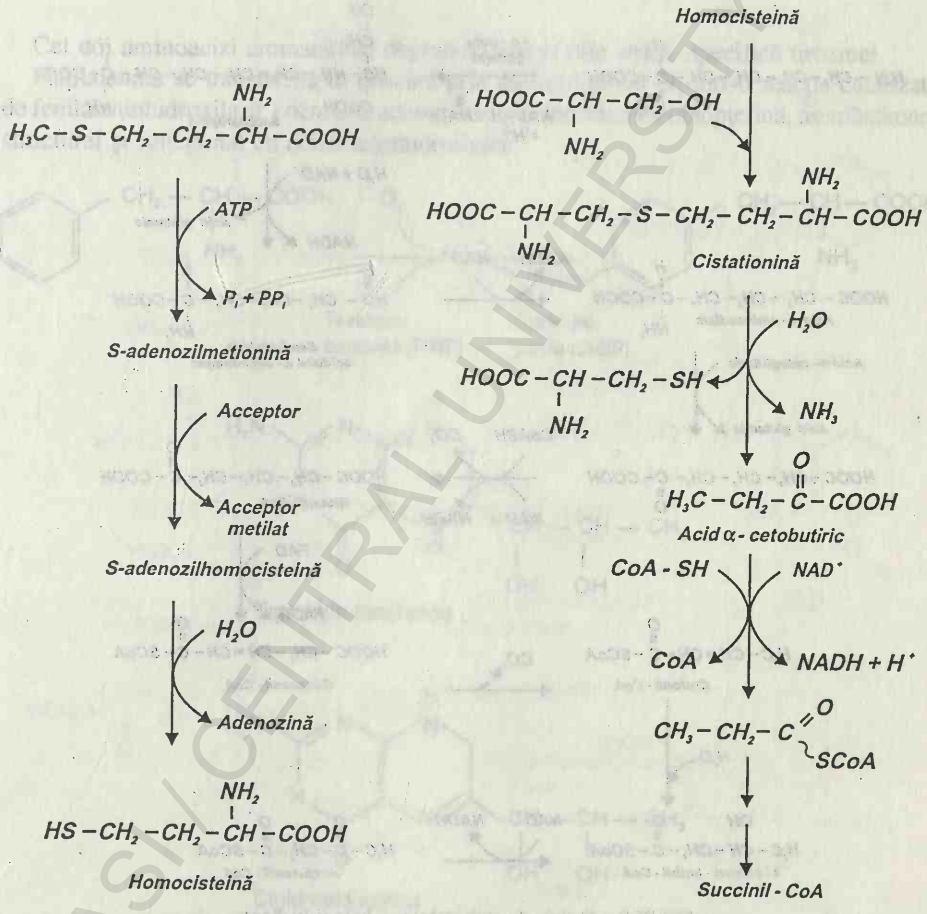


Fig. IX.8 - Catabolismul metioninei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX.6.6. LEUCINA ŞI LIZINA SE DEGRADEAZĂ LA ACID ACETOACETIC SAU ACETOACETIL-CoA

Degradarea leucinei a fost descrisă la punctul IX.6.5.

În organismele animale, dintre diferitele căi degradative cunoscute pentru lizină cea prin intermediarul saccharopină a fost identificată în ficat. Pentru a se ajunge la acetoacetil-CoA se parcurg nouă reacţii catalizate de enzime specifice (Fig. IX.9).

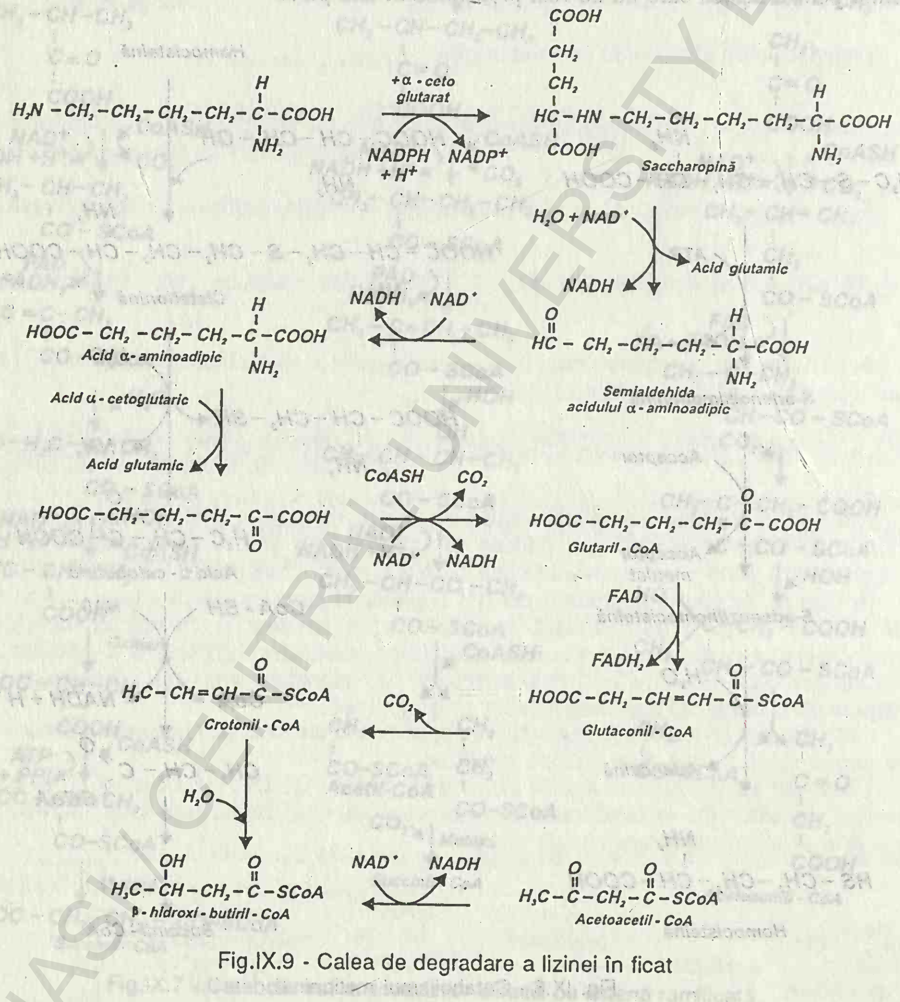


Fig.IX.9 - Calea de degradare a lizinei în ficat

Deoarece nici acidul acetoacetic, nici acetoacetil-CoA nu pot fi transformate în glucoză, leucina şi lizina sunt aminoacizi strict cetogeni.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

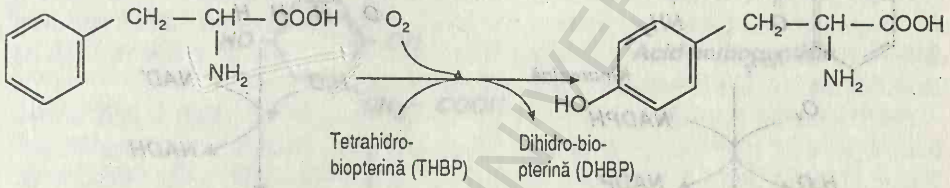
IX.6.7. TRIPTOFANUL SE DEGRADEAZĂ LA ACETIL-CoA ŞI ALANINĂ

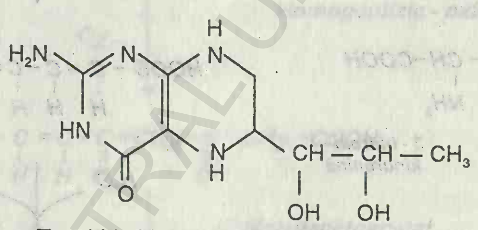
Degradarea are loc pe o cale complicată pe parcursul căreia heterociclul indolic se desface succesiv. De la un intermediar, acidul 3-hidroxiantranilic, se sintetizează cantităţi mici de vitamina PP; de aceea lipsa acestei vitamine poate fi suplinită parţial prin triptofan. Degradarea este redată în Fig. IX.10.

IX.6.8. FENILALANINA ŞI TIROZINA SE DEGRADEAZĂ LA ACID FUMARIC ŞI ACID ACETOACETIC

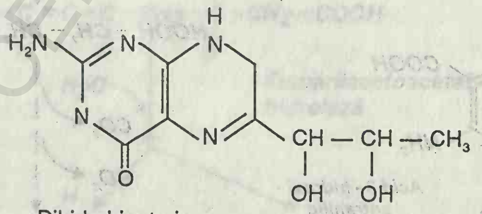
Cei doi aminoacizi aromatici se degradează pe o cale unică, specifică tirozinei.

Fenilalanina se transformă în tirozină prin hidroxilare cu O_2 într-o reacţie catalizată de fenilalaninhidroxilază: coenzima acestei enzime este tetrahidrobiopterina, asemănătoare structural şi funcţional cu acizii tetrahidrofolici:





Tetrahidrobiopterina



Dihidrobiopterina

În cursul catabolizării tirozinei (Fig. IX.11), o reacţie importantă este deschiderea nucleului benzenic sub acţiunea homogentizatoxidazei; această reacţie implică participarea vitaminei C, glutationului şi a ionilor Fe^{2+} şi Cu^{2+}.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

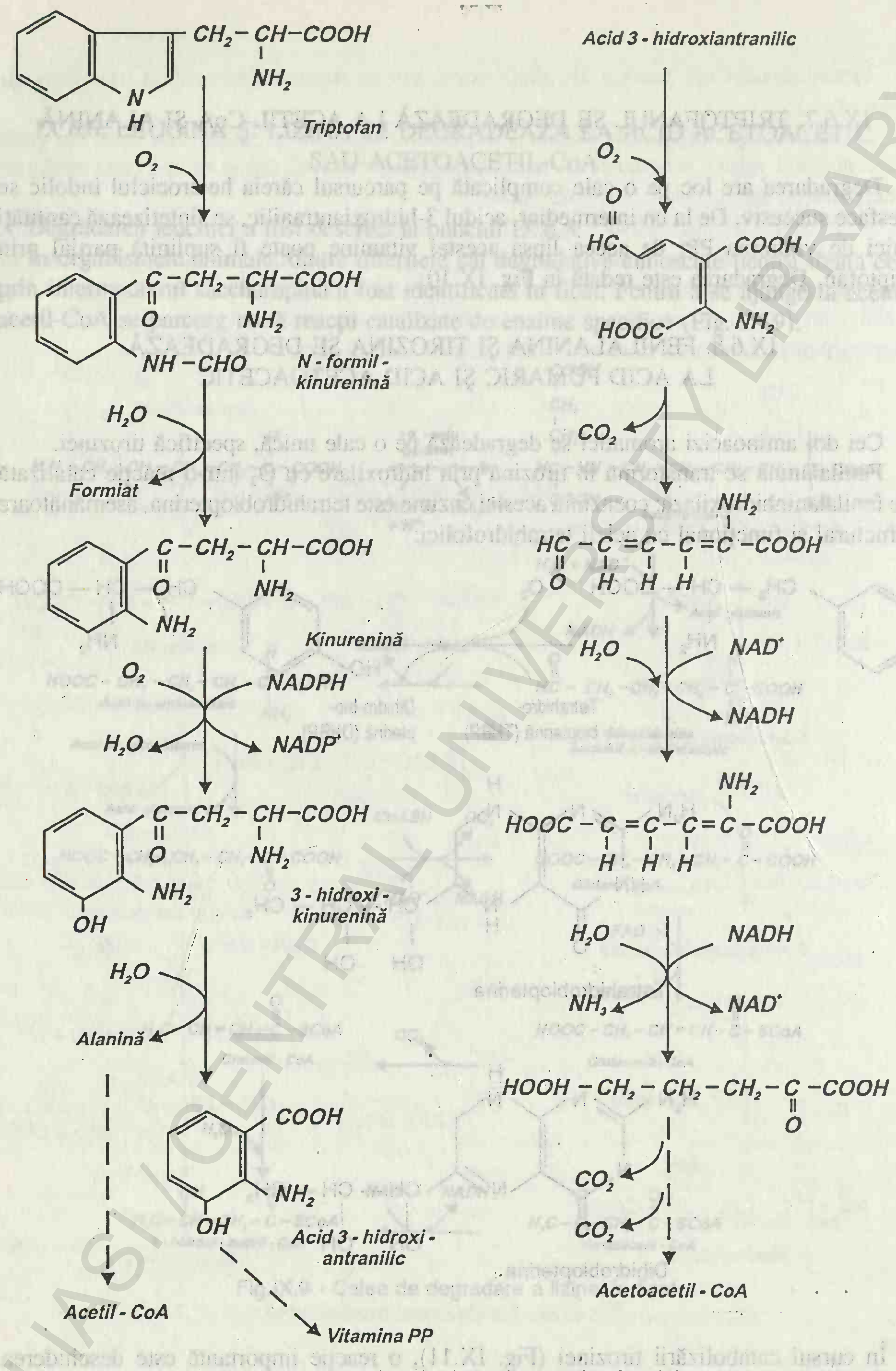


Fig. IX.10 - Calea de degradare a triptofanului

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

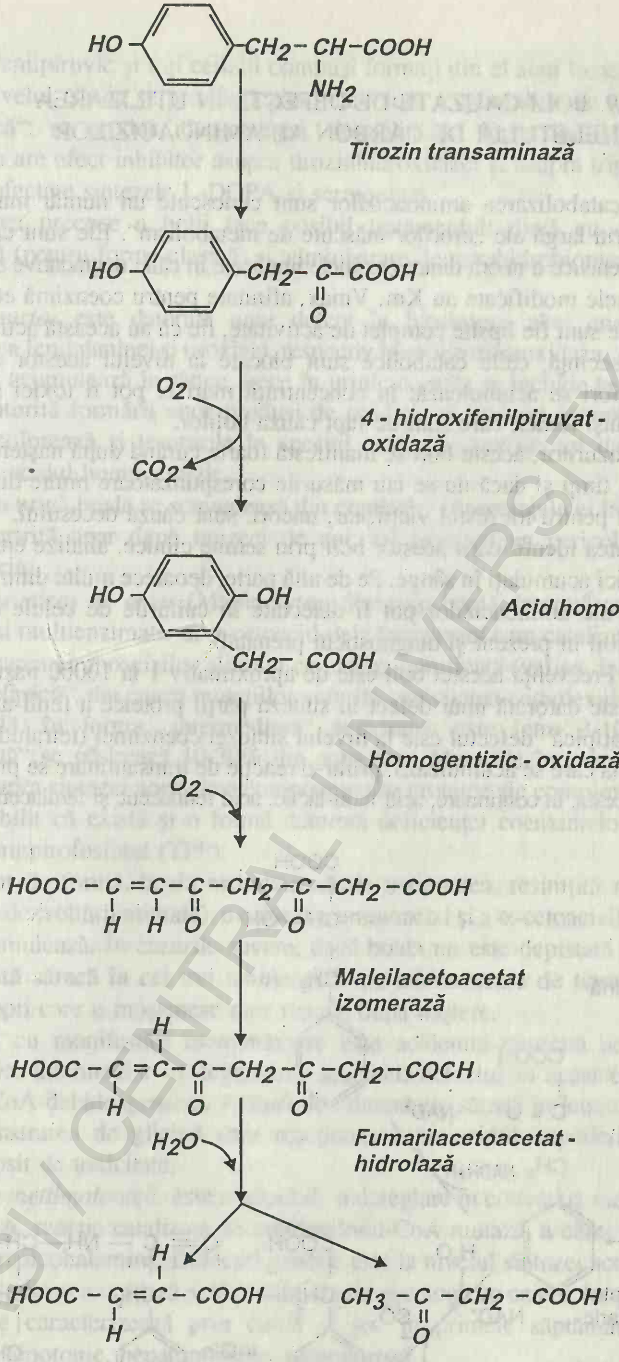


Fig. IX.11 - Conversia tirozinei în acid fumaric şi acid acetoacetic

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX.6.9. BOLI CAUZATE DE DEFECTE ÎN UTILIZAREA SCHELETULUI DE CARBON AL AMINOACIZILOR

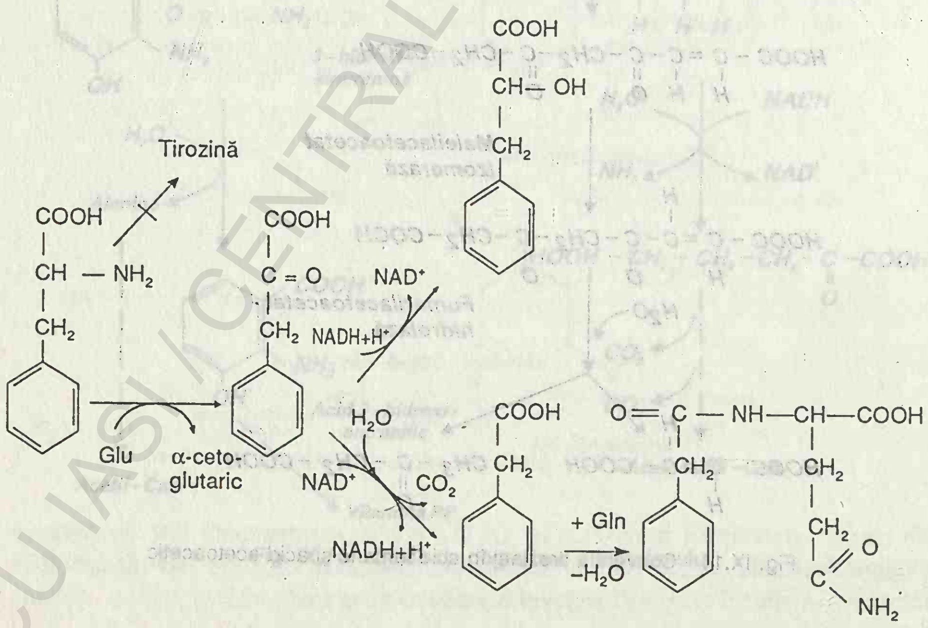
În legătură cu catabolizarea aminoacizilor sunt cunoscute un număr mare de boli cuprinse în categoria largă ale „erorilor înăscute de metabolism". Ele sunt cauzate mai ales de modificări genetice a unora dintre enzimele implicate în căile degradative specifice.

Deoarece enzimele modificate au Km, Vmax, afinitate pentru coenzimă etc., diferite de cele normale, ele sunt fie lipsite complet de activitate, fie că au această activitate mult diminuată. În consecință, căile catabolice sunt blocate la nivelul acestor enzime iar intermediarii anteriori se acumulează; în concentrații mari ei pot fi toxici sau pot da naştere la alţi produşi toxici, care sunt de fapt cauza bolilor.

În majoritatea cazurilor, aceste boli se manifestă foarte curând după naştere. Dacă nu sunt identificate la timp şi dacă nu se iau măsurile corespunzătoare multe dintre ele au consecinţe drastice pentru tot restul vieţii, iar, uneori, sunt cauza decesului.

Există posibilitatea identificării acestor boli prin semne clinice, analize enzimatice şi ale compuşilor toxici acumulaţi în sânge. Pe de altă parte, deoarece multe dintre enzimele căilor degradative ale aminoacizilor pot fi detectate în culturile de celule din fluidul amniotic, este posibil în prezent şi diagnosticul prenatal.

Fenilcetonuria. Frecvenţa acestei boli este de aproximativ 1 la 10000 naşteri. Forma numită „clasică" este datorată unui defect în sinteza părţii proteice a fenil-alaninhidroxilazei; în forma „atipică" defectul este la nivelul sintezei coenzimei (tetrahidrobiopterina). Din fenilalanina care se acumulează, printr-o reacţie de transaminare se produce acid fenilpiruvic şi din acesta, în continuare, acid fenil-lactic, acid fenilacetic şi fenilacetilglutamină:



Acidul fenilpiruvic şi toţi ceilalţi compuşi formaţi din el sunt toxici în special pentru creier la nivelul căruia se produc leziuni care sunt responsabile de aşa numita „idioţie fenilpiruvică"; se produc, deasemenea, demielinizări ireversibile. Pe de altă parte, fenilalanina are efect inhibitor asupra tirozinhidroxilazei şi asupra triptofanhidroxilazei, fiind deci afectate sintezele L-DOPA şi serotoninei.

Depistarea precoce a bolii face posibil tratamentul: dietă cu conţinut redus de fenilalanină (pentru forma clasică) şi administrare de tetrahidrobiopterină (pentru forma atipică).

Alcaptonuria: este datorată unui defect în biosinteza altei enzime implicată în catabolizarea fenilalaninei şi tirozinei, respectiv homogentizatoxidaza. Acidul homogentizic, care se acumulează în sânge, trece în urină; aceasta se închide la culoare în contact cu aerul datorită formării unor produşi de oxidare ai acidului homogentizic; în forme severe se colorează şi ţesuturile în special cele conjunctive, tot datorită pigmenţilor formaţi din acidul homogentizic.

Deşi prin urină boala se semnalează din copilărie, consecinţele ei între care o anumită formă de artrită apar după treizeci de ani; nu prezintă un pericol atât de mare ca fenilcetonuria.

Urina cu miros de arţar (Maple syrup disease): boală datorată activităţii scăzute a complexului multienzimatic al α-cetoacid-dehidrogenazei care catalizează a doua reacţie în catabolizarea aminoacizilor alifatici cu catena ramificată (valina, leucina, izoleucina). În forma „clasică", din cauza mutaţiilor suferite, activitatea complexului este sub 2% din cea normală, în forma „intermediară" activitatea este între 2-10% iar în forma „intermitentă" se păstrează 10-20% din activitate. Mutaţiile în cazul acestor forme se răsfrâng asupra sintezei normale a componentelor proteice ale complexului multienzimatic. S-a stabilit că există şi o formă datorată deficienţei coenzimelor din complex, în special tiaminpirofosfatul (TPP).

Indiferent de formă, boala este cauzată de toxicitatea, resimţită mai ales de creier (întârzierea dezvoltării mintale), a celor trei aminoacizi şi a α-cetoacizilor corespunzători, care se acumulează. În cazurile severe, dacă boala nu este depistată şi nu se intervine printr-o dietă săracă în cei trei aminoacizi sau administrare de tiamină (când lipseşte TPP-ul), copii care o moştenesc mor repede după naştere.

O boală cu manifestări asemănătoare este acidemia datorată acumulării de acid izovalerianic, intermediar în degradarea leucinei; defectul în acest caz este la nivelul izovaleril-CoA-dehidrogenazei. Alături de alimentaţie săracă în leucină în acest caz are efect adminstrarea de glicină care reacţionează cu acidul izovalerianic formând un complex lipsit de toxicitate.

Aciduria metilmalonică: este cauzată de o dereglare în conversia metilmalonil-CoA la succinil-CoA, reacţie catalizată de metilmalonil-CoA mutază, a cărei coenzimă este 5'-dezoxiadenozilcobalamina. Defectul genetic este la nivelul sintezei acestei coenzime din vitamina B_{12}. Se acumulează acid metilmalonic şi cetone cu catene lungi. Formele severe ale bolii se caracterizează prin comă şi şoc în primele săptămâni de viaţă. Alte consecinţe: hipotonie, hepatomegalie, osteoporoză.

Hiperoxaluria: constă în excreţia urinară a unor cantităţi mari de acid oxalic, nefrolitiază şi insuficienţă renală. Cauza aici este o deviaţie (datorată activităţii scăzute a enzimei α-cetoglutarat-carboxiligază) spre o cale obişnuit minoră a catabolizării glicinei,

cale ce conduce la formarea acidului oxalic; acesta formează cu calciul oxalat de calciu insolubil care se depune ca „pietre" în bazinetul rinichilor sau uretere.

Din şirul foarte lung al bolilor cauzate de defecte ale enzimelor ce catalizează reacţii ce fac parte din căile de catabolizare ale aminoacizilor se mai menţionează hiperprolinemiile, histidinemiile şi argininemiile.

IX.7. BIOSINTEZA AMINOACIZILOR NEESENŢIALI

IX.7.1. ASPECTE GENERALE

S-a arătat anterior că nouă din cei 20 de aminoacizi naturali nu pot fi sintetizaţi de către organismul uman (aminoacizii „esenţiali" sau „nutriţional indispensabili"), arginina fiind produsă în cantităţi mici, insuficiente în perioada de creştere (semiesenţial).

Analog degradării, în biosinteza aminoacizilor neesenţiali se disting o serie de aspecte generale dar şi numeroase căi particulare datorate, evident, diversităţii structurale ale acestor compuşi. După cum va reieşi, multe dintre reacţiile proceselor de biosinteză sunt comune cu cele de degradare, dar parcurse în sens invers.

Dintre aspectele generale importante sunt:

a) Sursele atomilor de carbon;

b) Sursa şi modul de încorporare a azotului.

a) Din studii realizate în special cu compuşi marcaţi a rezultat că scheletele de carbon ale aminoacizilor neesenţiali provin dintr-o serie de intermediari, în principal ai metabolismului glucidic: acidul α-cetoglutaric, acidul oxaloacetic (ciclul acizilor tricarboxilici), acidul piruvic şi acidul 3-fosfogliceric (glicoliza), ribozo-5-fosfat şi eritrozo-4-fosfat (calea pentozofosfaţilor). De la fiecare din aceşti compuşi se formează de regulă mai mulţi aminoacizi care constituie o familie (Fig. IX.12). În figură se redau sintezele tuturor aminoacizilor, dar sintezele de aminoacizi neesenţiali (valabile pentru organismul uman) sunt numai cele reprezentate prin săgeţi nebarate.

b) Singura sursă de azot pentru biosinteza aminoacizilor de către organismul uman o reprezintă amoniacul. O parte a amoniacului format prin degradarea compuşilor cu azot este utilizat în acest scop. La aceasta se adaugă amoniacul absorbit din intestin.

Calea cea mai însemnată de formare din amoniac a grupărilor amino ale aminoacizilor constă în parcurgerea în sens invers a reacţiilor catalizate de glutamatdehidrogenază şi aminoatransferaze. Deplasarea echilibrului reacţiilor catalizate de aceste enzime în sens catabolic sau anabolic este decisă de concentraţiile compuşilor cât şi de acţiunea unor mecanisme de reglaj extrem de eficiente. Astfel, glutamatdehidrogenaza este o enzimă alosterică (constând din şase subunităţi) care au locusuri specifice pentru mulţi modulatori. Reacţia generală catalizată de glutamatdehidrogenază, considerând dezaminarea acidului glutamic şi reacţia cu apa a acidului iminoglutaric, este:

$$\text{Acid-glutamic} + NAD^+ \text{ (sau } NADP^+) + H_2O \rightleftharpoons$$
$$\text{Acid-}\alpha\text{-cetoglutaric} + NH_3 + NADH + H^+ (NADPH + H^+)$$

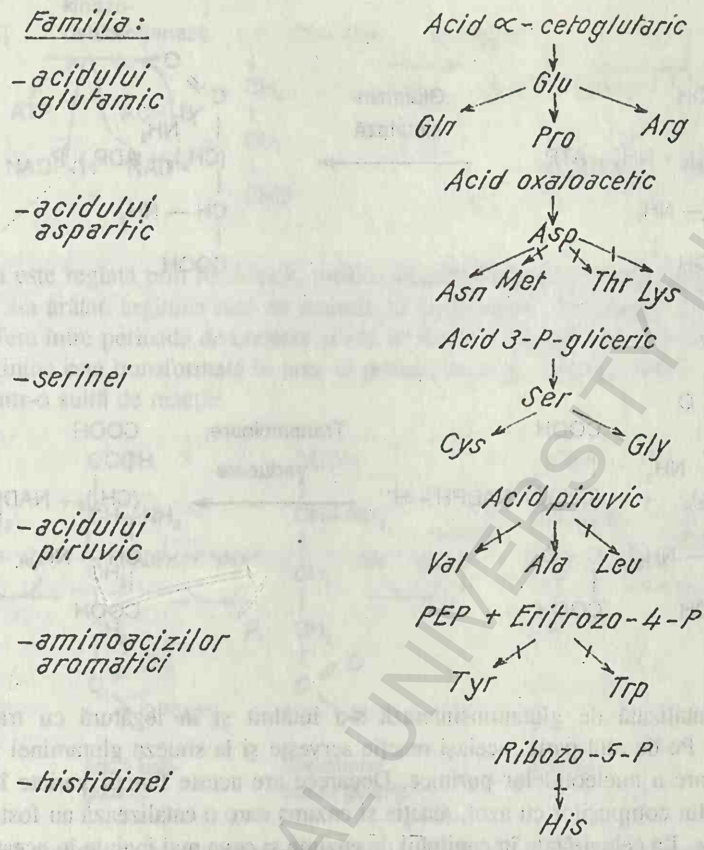


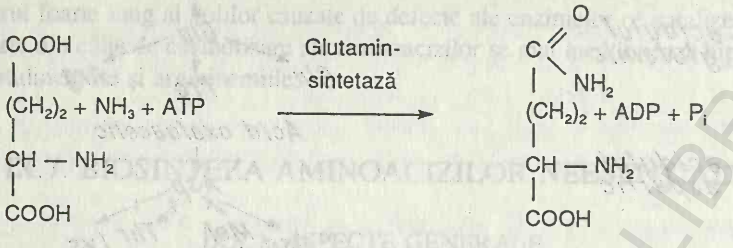
Fig. IX.12 - Schema generală de biosinteză a aminoacizilor pornind de la intermediari ai metabolismului glucidic

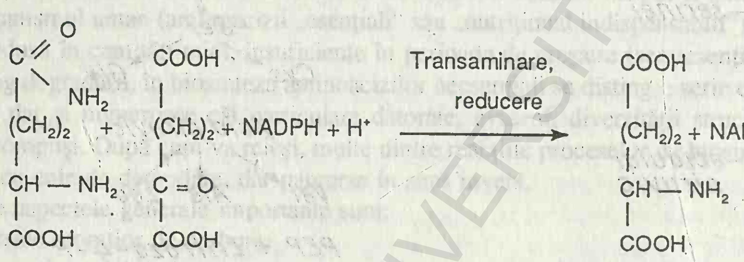
Echilibrul reacţiei poate fi deplasat spre dreapta prin activarea enzimei de către ADP şi GDP şi spre stânga sub acţiunea ATP şi GTP. Activitatea enzimei este controlată şi prin tiroxină şi hormoni steroizi, inclusiv prin coenzime: NAD^+ este utilizată prioritar la eliberarea NH_3 în timp ce NADPH + H^+ la fixarea acestuia (deci în procesul de biosinteză).

De pe acidul glutamic format prin reacţia generală de mai sus gruparea amino este transferată pe alte schelete de atomi de carbon, parcurgându-se tot în sens invers, reacţiile de transaminare.

Secundar, încorporarea amoniacului în aminoacizi are loc prin reacţiile cuplate catalizate de glutaminsintetază şi un complex enzimatic cu însuşiri de transaminază şi reductază:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY





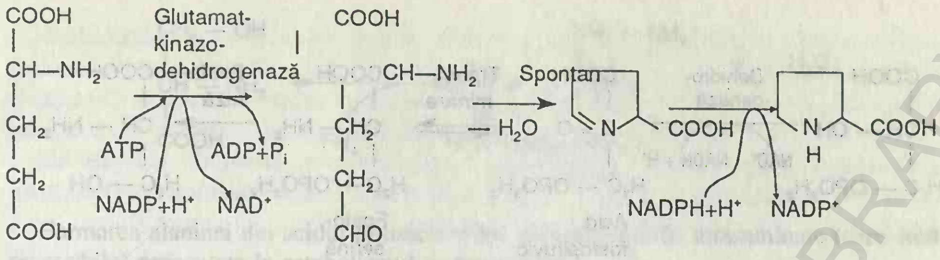
Reacţia catalizată de glutaminsintetază s-a întâlnit şi în legătură cu transportul amoniacului. Pe de altă parte, aceiaşi reacţie serveşte şi la sinteza glutaminei necesare căii de formare a nucleotidelor purinice. Deoarece are aceste funcţii variate în cadrul metabolismului compuşilor cu azot, reacţia şi enzima care o catalizează au fost studiate în profunzime. La cele arătate în capitolul de enzime şi ceva mai înainte în acest capitol, se adaugă că în organismele animale, pe fondul general al mecanismelor descrise, între glutaminsintetazele din ţesuturi diverse s-au remarcat diferenţe semnificative (număr diferit de efectori alosterici, sau chiar efectori diferiţi). În reacţia cuplată are loc o aminare reductivă a α-cetoglutaratului, donorul de azot fiind glutamina.

IX.7.2. CĂILE PARTICULARE DE BIOSINTEZĂ

Cele arătate în legătură cu aspectele generale au cuprins şi sintezele acidului glutamic şi glutaminei. În continuare se dau căile particulare de biosinteză ale celorlalţi aminoacizi neesenţiali, urmând schema generală din Fig. IX.12.

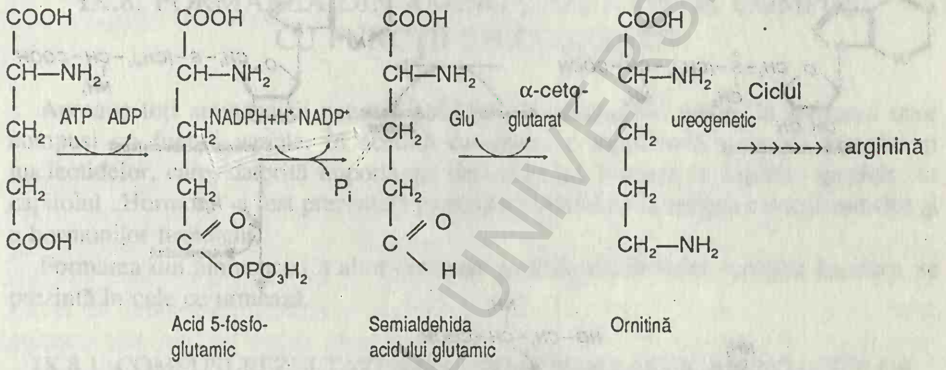
Prolina se sintetizează din acidul glutamic prin parcurgerea în sens invers a reacţiilor din calea degradativă; mici diferenţe apar la formarea semialdehidei acidului glutamic care în biosinteză este catalizată de o kinază-dehidrogenază şi la ultima reacţie catalizată de o dehidrogenază cu coenzimă NADPH:

BCU CLUJ-UNIVERSITY LIBRARY



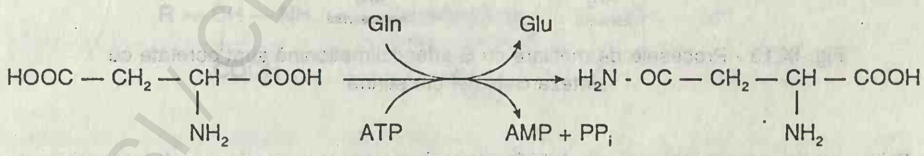
Calea este reglată prin feed back, prolina inhibând alosteric prima enzimă.

Cum s-a arătat, arginina este un aminoacid semiesenţial. Se admite că nu sinteza ca atare diferă între perioada de creştere şi cea de după aceasta ci viteza mult mai mare cu care arginina este transformată în uree în prima perioadă. Sinteza, la om, a argininei se face printr-o suită de reacţii:



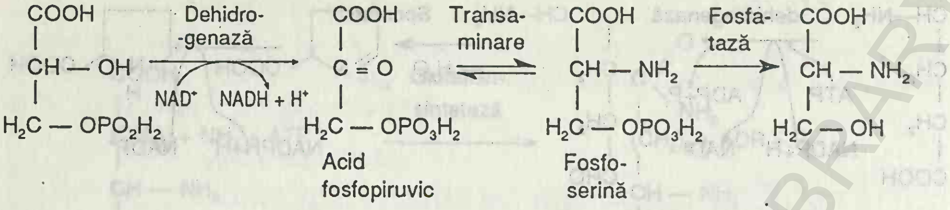
Acidul aspartic se sintetizează din acidul oxaloacetic prin transaminare, de exemplu în prezenţa GOT (vezi catabolismul aminoacizilor).

În organismele animale, formarea asaparaginei din acidul aspartic are loc printr-o reacţie numai parţial asemănătoare formării glutaminei din acidul glutamic; enzima, asparaginsintetaza, utilizează însă glutamina drept sursă de grupare-NH_2, iar ATP este scindat la AMP + PP_i



Transformarea acidului 3-fosfogliceric în serină are loc prin secvenţa de reacţii:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Serina participă la sinteza cisteinei în cadrul unui proces complex corelat cu transferul de radicali metil de către S-adenozil-metionină. Cedând metilul unor acceptori, S-adenozil-metioninia se transformă în S-adenozilhomocisteina, care, în reacţie cu serina, formează cisteina (Fig. IX.13):

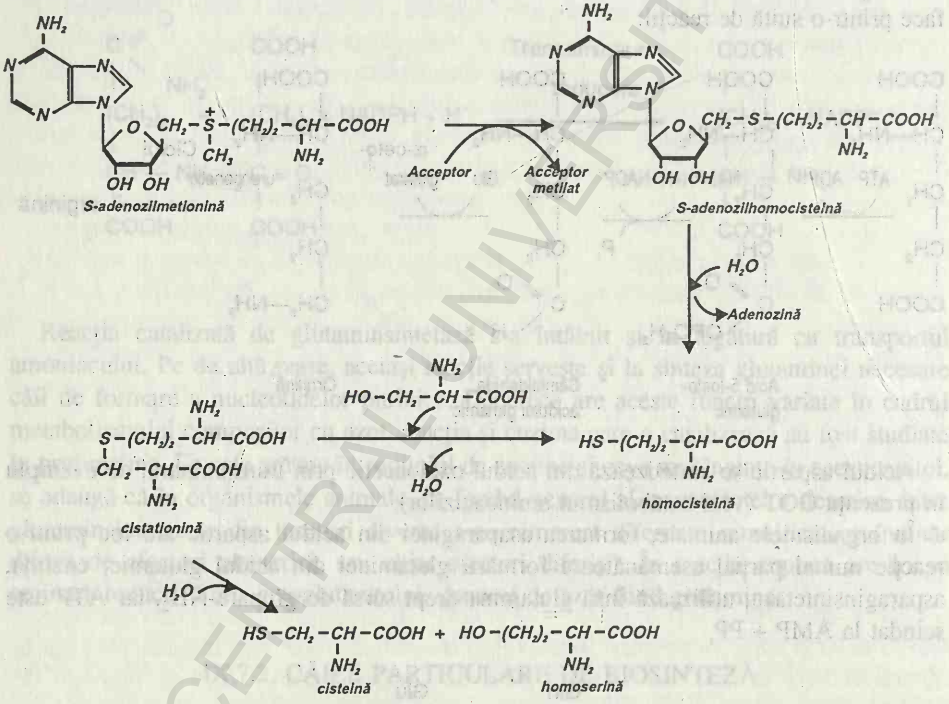
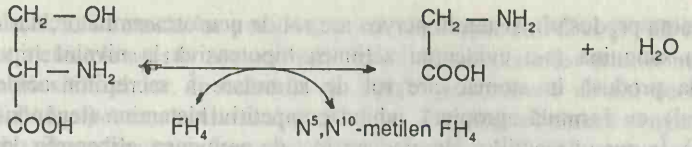


Fig. IX.13 - Procesele de metilare cu S-adenozilmetionină sunt corelate cu sinteza cisteinei din serină

Prin reacţia succesivă a unei dehidrataze şi a unei transaminaze, homoserina se transformă în acid α-cetobutiric, care, prin decarboxilare, conduce la propionil~CoA şi în final la succinil~CoA.

Prin cedarea fragmentului de un carbon acidului tetrahidrofolic, serina se transformă în glicocol, reacţia aceasta fiind reversibilă (vezi importanţa acestei transformări în Cap. „Vitamine şi coenzime"):

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Formarea alaninei din acidul piruvic are loc prin reacţiile de transaminare (care sunt reversibile) prezentate la catabolismul aminoacizilor.

Biosinteza tirozinei se face de la fenialanină care se hidroxilează în prezenţa fenilalnin hidroxilazei (vezi catabolizarea fenilalaninei şi tirozinei). Deoarece fenilalanina este aminoacid esenţial, formarea în cantităţile necesare a tirozinei depinde de aportul prin hrană a fenilalaninei.

IX.8. FORMAREA DIN AMINOACIZI A UNOR COMPUŞI CU FUNCŢII SPECIALIZATE

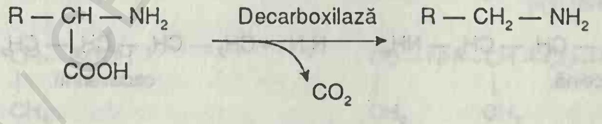
Aproape toţi aminoacizii naturali participă, în organismul uman, la formarea unor compuşi cu funcţii variate. În această categorie se încadrează sintezele hemului şi nucleotidelor, care, datorită importanţei deosebite, se tratează în capitole speciale. În capitolul „Hormoni" a fost prezentată participarea tirozinei la sinteza catecolaminelor şi a hormonilor tiroidieni.

Formarea din aminoacizi a altor compuşi specializaţi, inclusiv funcţiile acestora, se prezintă în cele ce urmează.

IX.8.1. COMPUŞI REZULTAŢI PRIN DECARBOXILAREA AMINOACIZILOR

În organism, o bună parte dintre aminoacizi pot fi decarboxilaţi; se formează amine primare numite amine biogene. Enzimele care catalizează reacţiile se numesc decarboxilaze; unele dintre acestea au specificitate absolută, altele au specificitate de grup. Toate au însă aceeaşi coenzimă şi anume piridoxal-fosfatul.

Simplificat, reacţiile de decarboxilare se redau prin:



În realitate, aminoacidul formează mai întâi o bază Schiff cu piridoxalfosfatul şi sub această formă are loc decarboxilarea; în final, amina se desprinde de coenzimă.

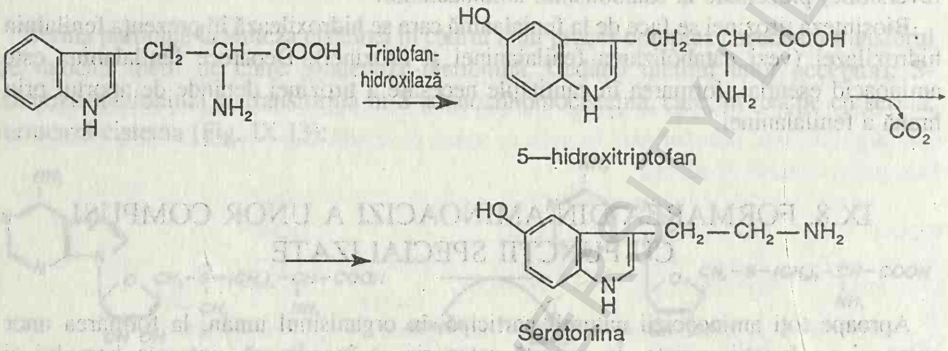
Câteva enzime biogene importante:

Histamina, rezultă din histidină; enzima este L-aminoacid-decarboxilaza care mai catalizează decarboxilarea DOPA, 5-hidroxitriptofanului, fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Histamina produsă în sistemul nervos are rol de neurotransmitator, dar controlează şi presiunea sanguină (s-a evidenţiat acţiunea hipotensivă la nivelul hipotalamusului). Histamina produsă în stomac are rol de stimulare a secreţiilor acide. Cimetidina (tagametul), cu formulă apropiată, inhibă competitiv histamina (legându-se de aceiaşi receptori). În cursul reacţiilor alergice are loc, de asemenea, eliberarea de histamină.

Serotonina rezultată din triptofan care mai întâi se hidroxilează şi apoi se decarboxilează (în prezenţa L-aminoacid-decarboxilazei):



Serotonina se sintetizează în sistemul nervos cetral unde are rol de mediator chimic controlând funcţii motorii: senzaţia dureroasă, comportamentul sexual. Producerea isuficientă sau degradarea rapidă la acid metoxi-indolilacetic, care este forma de eliminare din organism, determină stări depresive. Inhibitori ai monoamino-oxidazei (MAO), principala enzimă din calea degradativă, ca acidul lisergic, prelungesc durata de viaţă a serotoninei în organism. Se mai sintetizează în celule cromafine din alte ţesuturi, îndeplinind, între altele, rol de vasoconstrictor şi stimulator al contracţiei musculaturii netede.

Acidul γ-aminoabutilric (GABA), cu formula $H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$, rezultă prin decarboxilarea, care are loc numai în sistemul nervos, a acidului glutamic; enzima este specifică, glutamat-decarboxilaza. GABA ca şi glicina, sunt neurotransmiţători de tip inhibitor. Fixarea lor pe receptori la nivelul membranei post sinaptice creşte permeabilitatea pentru ionul Cl^- determinând hiperpolarizarea acesteia.

Putresceina (1,4-diaminobutan) şi cadaverina (1,5-diaminopentan) rezultă prin decarboxilarea ornitinei, respectiv lizinei.

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2 \qquad H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2$$

putresceină — cadaverină

Prin condensări între ele, dar şi cu 1,3-diaminopropanul, rezultă compuşi poliaminici mai simpli (spermidina), sau mai complicaţi (spermina).

$$H_3N^+ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - N^+H_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - N^+H_3$$

Spermidina (ionizată)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Poliaminele, datorită sarcinilor pozitive, se asociază uşor cu ADN şi ARN care sunt polianioni; între efectele acestor asocieri sunt stabilizarea structurilor acizilor nucleici dar şi stimularea biosintezei lor. În culturile de celule, poliaminele au rol de factori de creştere; sunt, de asemenea, stabilizatori ai celulelor, organitelor celulare şi membranelor.

Prin decarboxilarea serinei se formează colamina, care, prin metilare, formează colina; aceşti aminoalcooli intră în structura unor lipide complexe (lecitine, cefaline). Cu acetil-CoA, colina formează acetilcolina care este mediator chimic la nivelul joncţiunilor neuromusculare.

Prin decarboxilarea cisteinei se formează tioetanolamina (cisteamina) care este component al coenzimei A.

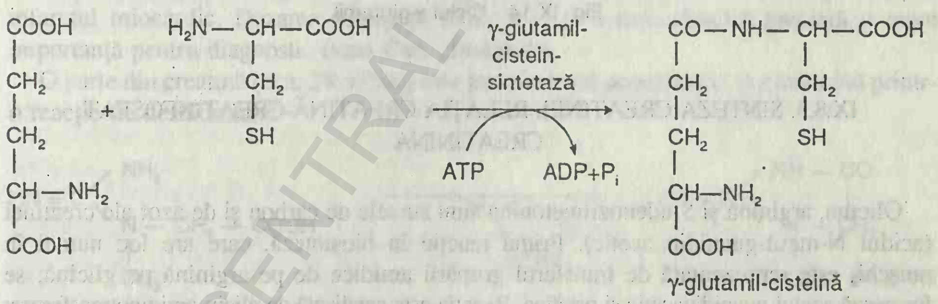
Din acidul aspartic se pot forma doi compuşi de decarboxilare:

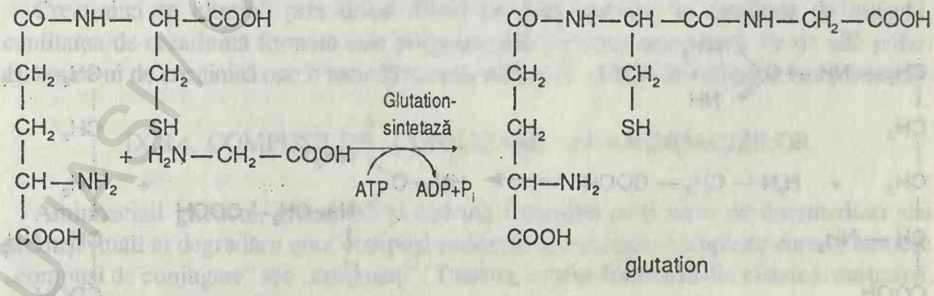
- α-alanina dacă decarboxilarea are loc la C_β;
- β-alanina dacă decarboxilarea are loc la C_α.

Totuşi formarea β-alaninei, care este de asemenea, component al coenzimei A, nu a fost identificată la om; se pare că aici singura sursă de β-alanină o reprezintă degradarea pirimidinelor.

IX.8.2. BIOSINTEZA GLUTATIONULUI

Spre deosebire de multe peptide (care se obţin prin prelucrarea post traducere a unor proteine, cum este cazul prelucrării proopiomelanocortinei POMC), glutationul (γ-glutamil-cisteinil-glicina) se sintetizează direct din cei trei aminoacizi. Pentru fiecare dintre legăturile peptidice care se formează se consumă câte o moleculă de ATP. Cele două reacţii şi enzimele care le catalizează sunt:





BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ficat şi în rinichi s-a evidenţiat că aceste reacţii fac parte dintr-un ciclu numit „γ-glutamil" care cuprinde biosinteza glutationului dar şi degradarea sa simultană cu transferul aminoacizilor prin membrana celulară (Fig. IX.14). În acest ciclu rolul esenţial îl are enzima γ-glutamil-transpeptidaza (γGT), localizată în membrană; ea asigură formarea între acidul glutamic eliberat din glutation şi aminoacizi a unor complexe acid glutamic-aminoacid din care în citosol se eliberează aminoacizii şi acidul glutamic. Numeroasele funcţii ale glutationului au fost prezentate în alte capitole.

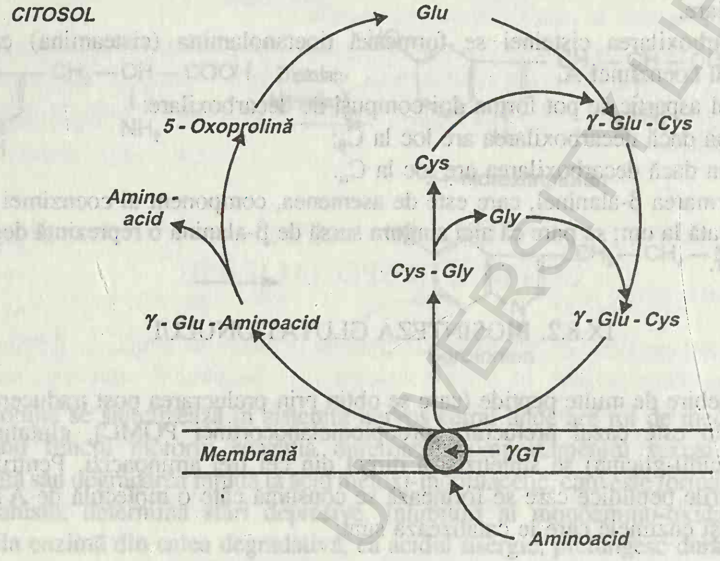
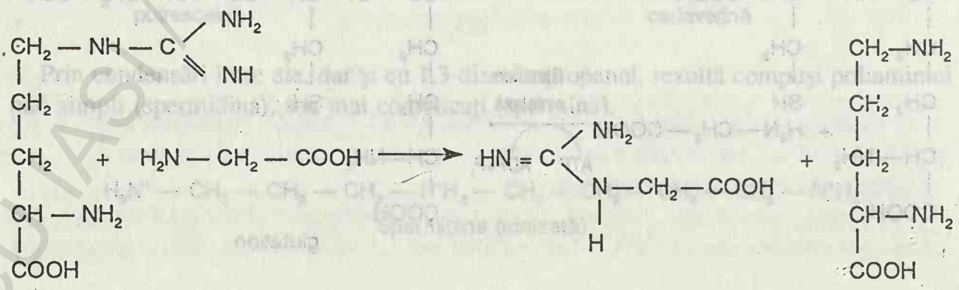


Fig. IX.14 - Ciclul γ-glutamil

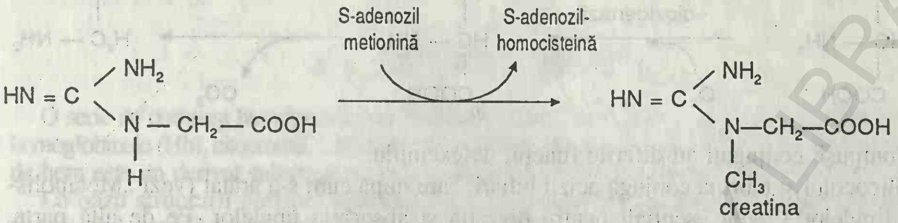
IX.8.3. SINTEZA CREATINEI. RELAŢIA CREATINĂ-CREATINFOSFAT. CREATININA

Glicina, arginina şi S-adenozilmetonina sunt sursele de carbon şi de azot ale creatinei (acidul N-metil-guanidin acetic). Prima reacţie în biosinteză, care are loc numai în muşchi, este reprezentată de transferul grupării amidice de pe arginină pe glicină; se formează acidul guanidinacetic şi ornitina. Reacţia este catalizată de glicin-amidinotransferaza:

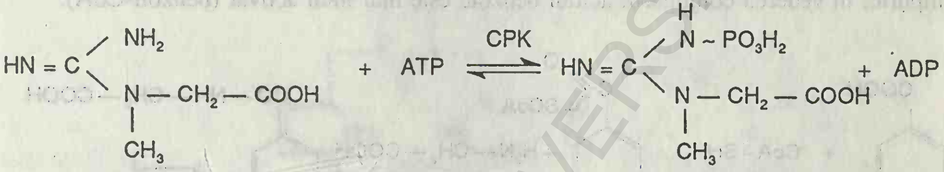


BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În reacţia următoare, acidul guanidinacetic este metilat de către S-adenozilmetionină: se formează creatina:



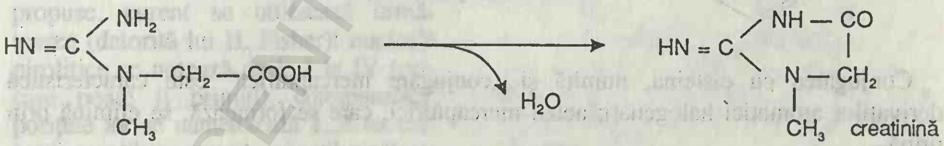
După cum s-a văzut (Cap. „Energetica biochimică"), când concentraţia de ATP din muşchi este ridicată creatina este fosforilată în reacţia catalizată de creatinfosfokinază:



Creatinfosfatul este singurul compus cu legături macroergice pe care organismul îl poate depozita în anumite limite şi numai în muşchi. În debutul unui efort fizic creatinfosfatul reformează ATP-ul, tot prin reacţia catalizată de CPK; eliberarea ATP-ului din creatinfosfat este mai rapidă decât formarea lui pe seama glicolizei sau a lanţului respirator.

Creatinfosfokinaza serică este una dintre enzimele a cărei activitate creşte mult în infarctul miocardic. Dozarea activităţii totale a ei şi a izoenzimelor prezintă o mare importanţă pentru diagnostic (vezi Cap. „Enzime").

O parte din creatină (cca. 2% zilnic) este transformată neenzimatic în creatinină printr-o reacţie de deshidratare:

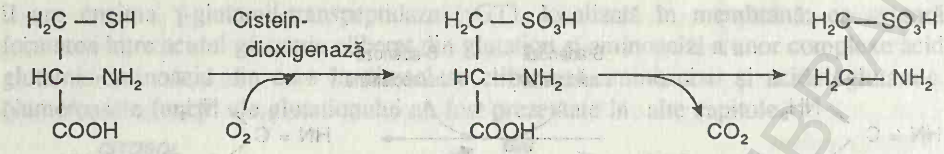


Creatinina se elimină prin urină. Fiind produsă aproape în totalitate de muşchi, cantitatea de creatinină formată este proporţională cu masa musculară. Pe de altă parte, clearence-ul de creatinină este o metodă simplă, extrem de utilă în investigarea funcţiei renale.

IX.8.4. COMPUŞII DE „CONJUGARE" AI AMINOACIZILOR

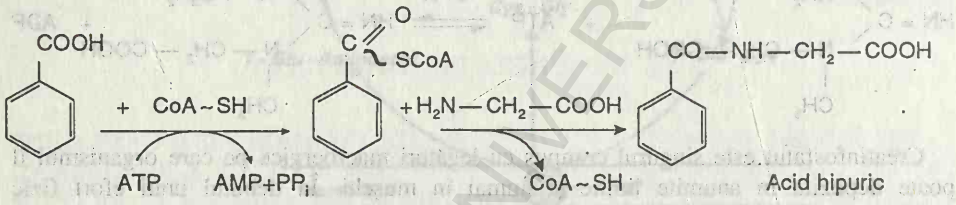
Aminoacizii glicocol, glutamină şi cisteină formează cu o serie de intermediari sau produşi finali ai degradării unor compuşi endogeni sau exogeni complexe care se numesc „compuşi de conjugare" sau „conjugaţi". Taurina, care se formează din cisteină, participă, de asemenea, la conjugări:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



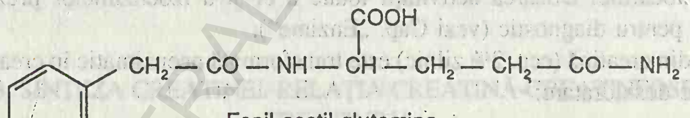
Compuşii conjugaţi au diferite funcţii, de exemplu:

Glicocolul şi taurina conjugă acizii biliari, care după cum s-a arătat (vezi „Metabolismul lipidelor"), sunt esenţiali pentru digestia şi absorbţia lipidelor. Pe de altă parte, glicocolul conjugă o serie de acizi organici de origine exogenă sau endogenă. Astfel forma de eliminare din organism a acidului benzoic este benzoil-glicina sau acidul hipuric; în vederea conjugării, acidul benzoic este mai întâi activat (benzoil-CoA):



Acid hipuric

Aminoacizii aromatici cu gruparea carboxil în catena laterală se conjugă cu glutamina; de exemplu acidul fenilacetic formează cu glutamina fenil-acetilglutamina:



Fenil-acetil-glutamina

Conjugarea cu cisteina, numită şi „conjugare mercapturică" este caracteristică derivaţilor aromatici halogenaţi; acizii mercapturici, care se formează, se elimină prin urină.

Întrucât conjugările au loc la nivelul ficatului, starea funcţională a acestui organ poate fi investigată şi prin capacitatea de conjugare; în acest scop se dozează acidul hipuric după patru ore de la ingerarea unei doze test de benzonat de sodiu.

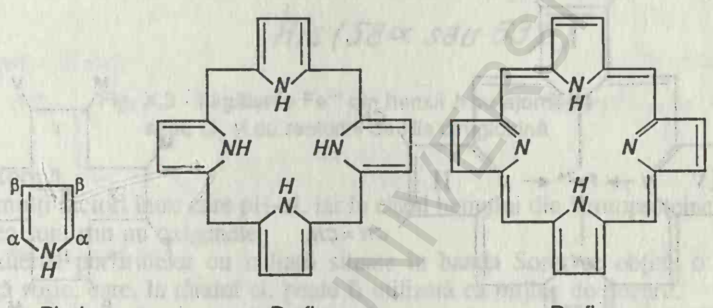
BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. X. METABOLISMUL HEMOPROTEINELOR

X.1. ASPECTE CHIMICE

O serie de compuşi heteroproteici cu importante funcţii biologice cum sunt mioglobinele (Mb), hemoglobinele (Hb), citocromii, catalazele, au ca grupări prostetice variante de hem. Oricare formă de hem este un derivat substituit şi complexat cu fier al heterociclului numit porfină.

La baza structurii porfinei stau patru nuclee pirolice legate prin patru punţi metinice (la nivelul atomilor de carbon α). Importanţă are şi derivatul hidrogenat al porfinei, numit porfinogen, în care punţile metin sunt înlocuite cu punţi metilen:



Pirol Porfinogen Porfina

Porfinogenul şi porfina nu apar în stare liberă în organismele vii deoarece în cursul biosintezei se formează direct derivaţii substituiţi ai acestora iar catabolizarea începe, la rândul ei, cu deschiderea sistemului tetrapirociclic substituit.

Precizarea poziţiei substituienţilor pe porfină şi porfinogen reclamă modalităţi precise de numerotare; dintre cele propuse, curent se utilizează următoarea (datorită lui H. Fisher): nucleele pirolitice se notează de la I la IV (oricare poate fi primul), corespunzător, poziţiile lor se numerotează 1...8 iar carbonii punţilor metinice (metilenice) se notează α...δ (Fig. X.1).

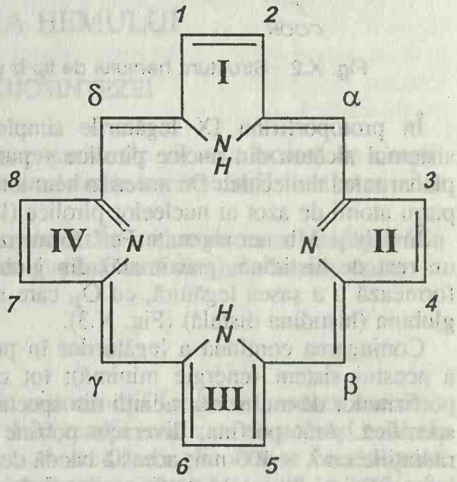


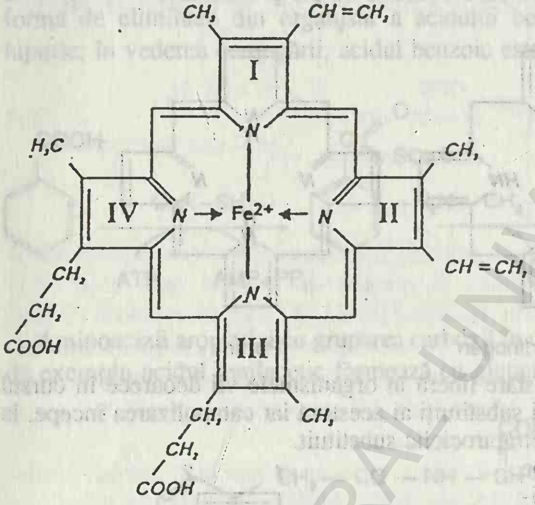
Fig. X.1 - Numerotarea nucleelor pirolice şi a atomilor de carbon în porfină şi porfinogen

Derivaţii porfinei care au câte un substituient la fiecare dintre carbonii 1...8, se numesc porfirine iar derivaţii corespunzători ai porfinogenului se numesc porfirinogeni. Între aceştia se află protoporfirinele şi protoporfirinogenii care au câte 4 substituienţi metil, câte 2 substituienţi vinil şi câte 2 resturi de acid propionic. Izomerii numeroşi sub forma cărora există protoporfi-

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

rinele (protoporfirinogenii) l-a determinat pe H. Fisher să-i aşeze într-o anumită ordine notându-i cu cifre romane.

Protoporfirina IX, care împreună cu Fe^{2+} (pe care îl complexează) constituie hemul din Hb şi Mb (corect hem *b*), are următoarea aşezare a substituienţilor: în poziţiile 1, 3, 5, şi 8 metil, în poziţiile 2 şi 4 vinil iar în poziţiile 6 şi 7 resturi de acid propionic. Hemul acesta este cel mai răspândit în organismul uman (peste 95% din total). Alte hemuri întâlnite sunt cel notat *a* care diferă de *b* prin substituienţii de la C_1 şi C_8 (o catenă cu trei resturi izoprenice, respectiv o grupare formil) şi hemul *c* care diferă de *b* prin substituienţii de la C_2 şi C_4 (ambii radicali etil). Aceste hemuri se află în structurile citocromilor, notaţi corespunzător *a* şi *c*. În Fig. X.2 se redă structura hemului *b* (care însă, pentru a fi stabil, trebuie să formeze o legătură prin intermediul Fe^{2+}) şi un mod simplificat de redare a acestuia (unde M = metil, V = vinil, P = resturi de acid propionic). Discuţia următoare se focalizează asupra hemului *b*.



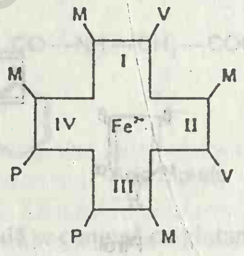


Fig. X.2 - Structura hemului de tip b şi o reprezentare simplificată a acestuia

În protoporfirina IX legăturile simple alternează cu legăturile duble pe întreg sistemul alcătuit din nuclee pirolice + punţi metinice. Conjugarea continuă determină planaritatea moleculei. De aceea în hem ionul de Fe^{2+} este legat în mod echivalent de cei patru atomi de azot ai nucleelor pirolice (legături coordinative).

În Hb şi Mb neoxigenate Fe^{2+} formează o altă legătură coordinativă (a cincea) cu un rest de histidină (proximală) din globină; în starea oxigenată a Hb şi Mb fierul formează o a şasea legătură, cu O_2, care se interpune între Fe^{2+} şi o altă histidină din globina (histidina distală) (Fig. X.3).

Conjugarea continuă a legăturilor în protoporfirină determină şi o mare stabilitate a acestui sistem (energie minimă); tot conjugarea explică şi capacitatea ridicată a porfirinelor de a absorbi radiaţii din spectrul vizibil fapt căruia li se datorează culoarea specifică. Atât porfina, diversele porfine substituite cât şi hemul absorb în special radiaţiile cu $\lambda \approx 400$ nm; această bandă de absorbţie se numeşte banda Soret şi pe baza intensităţii ei diversele porfirine pot fi dozate. Protoporfirina IX, hemul, alte porfirine, prezintă şi alte benzi de absorbţie (mai puţin intense) în jurul valorilor de 550-600 nm, al căror

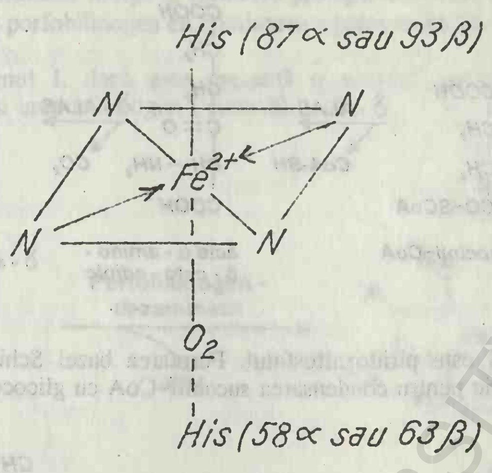


Fig. X.3 - Legăturile Fe^{2+} din hemul *b* cu atomii de azot, O_2 şi cu resturile de His din globină

număr şi formă
depind de mulţi factori între care pH-ul, iar în cazul hemului din hemoproteine de faptul dacă acestea sunt sau nu oxigenate.

Prin iradierea porfirinelor cu radiaţii situate în banda Soret se obţine o puternică fluorescenţă roşie, care, la rândul ei, poate fi utilizată ca mijloc de dozare.

Lipsa conjugării continue, cum este în cazul copro- şi uroporfirinelor (vezi biosinteza) se traduce prin lipsa culorii.

X.2. BIOSINTEZA HEMULUI

X.2.1. ETAPELE BIOSINTEZEI

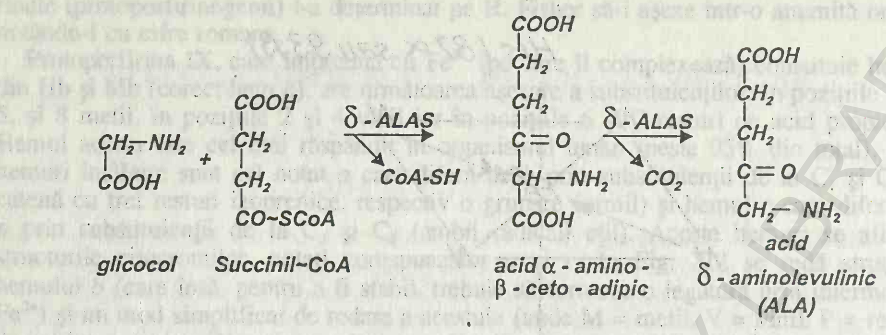
Compuşii din care se sintetizează hemul în organismele vii sunt extrem de simpli: aminoacidul glicocol şi succinil~CoA care este unul dintre intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici.

Biosinteza are loc în toate ţesuturile dar cu intensitate mai mare ea se desfăşoară în celulele sistemului eritroformator din măduvă, ficat şi splină; se disting următoarele etape:

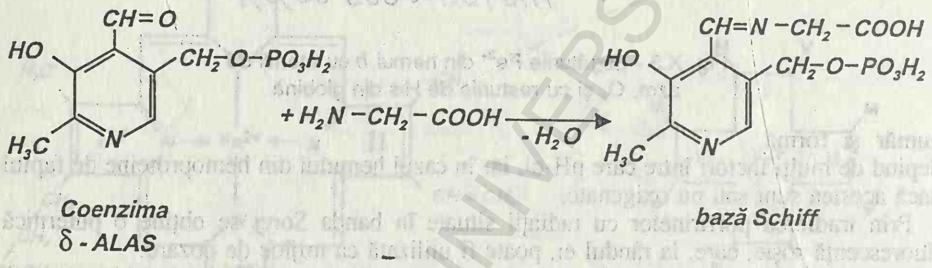
- sinteza acidului δ-aminolevulinic;
- formarea porfobilinogenului;
- formarea protoporfirinei IX;
- unirea protoporfirinei IX cu Fe^{2+}.

Sinteza acidului δ-aminolevulinic are loc în mitocondrii (unde se produce succinil-~CoA). Redată simplificat, sinteza constă din două reacţii catalizate de aceeaşi enzimă, δ-aminolevulinatsintaza (δ-ALAS); mai întâi o moleculă de glicocol se condensează cu una de succinil-CoA formându-se un intermediar instabil, acidul α-amino-β-cetoadipic, prin a cărui decarboxilare rezultă apoi acidul δ-aminolevulinic (ALA):

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

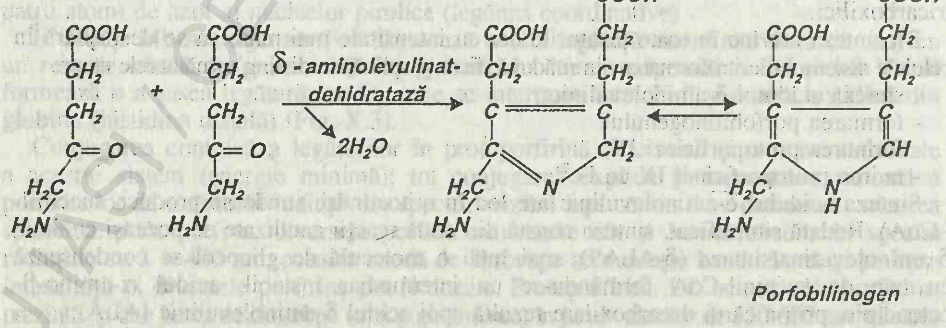


Coenzima δ-ALAS este piridoxalfosfatul. Formarea bazei Schiff între aceasta şi glicocol este obligatorie pentru condensarea succinil~CoA cu glicocolul.



Eliberarea grupării amino a ALA are loc numai după formarea acidului δ-aminolevulinic, printr-o reacţie de hidroliză.

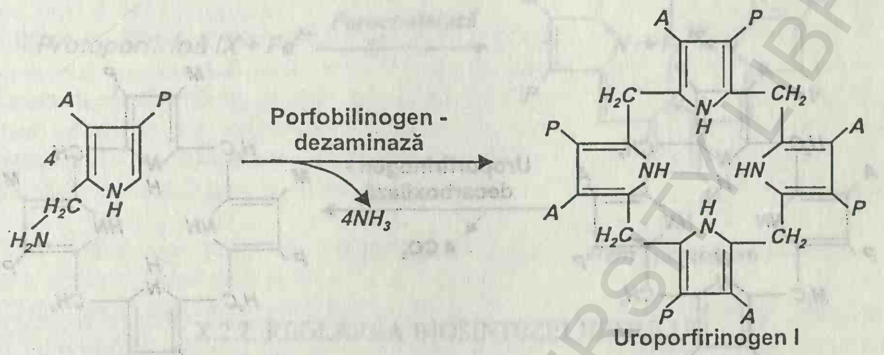
ALA trece din mitocondrie în citosol unde se sintetizează mai întâi porfobilinogenul. Sinteza constă în condensarea a două molecule de acid δ-aminolevulinic cu eliminarea a două molecule de apă; porfobilinogenul este un derivat trisubstituit al pirolului. Reacţia este catalizată de enzima δ-aminolevulinatdehidratază, numită şi porfobilinogen-sintază.



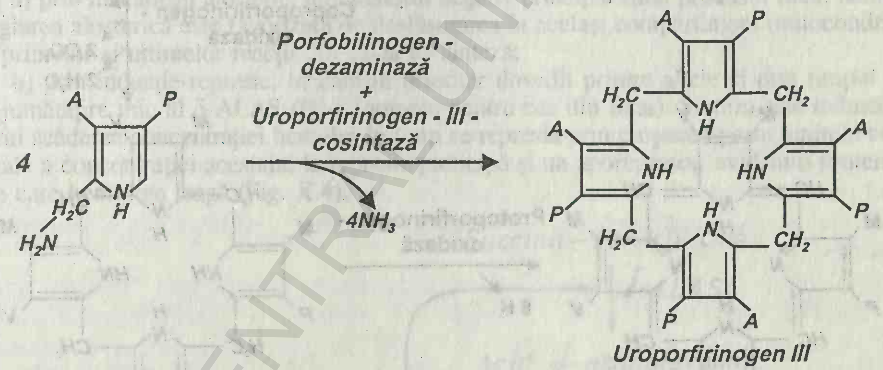
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prima din şirul multelor reacţii în formarea protoporfirinei IX constă în condensarea a patru molecule de porfobilinogen cu eliminarea a patru molecule de amoniac. Produsul condensării este:

- uroporfirinogenul I, dacă este prezentă o singură enzimă, porfobilinogendezaminaza (numită şi uroporfirinogen I sintază):



- uroporfirinogenul III, dacă sincron cu porfobilinogendezaminaza acţionează enzima uroporfirinogen III cosintază:

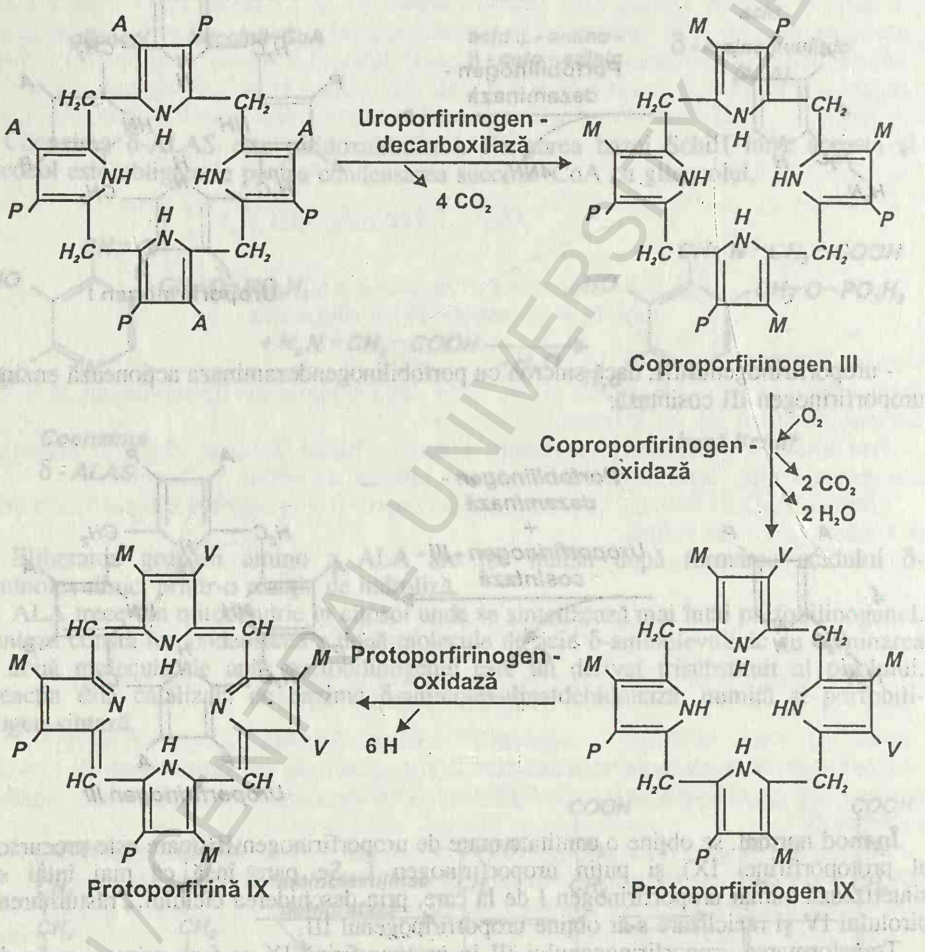


În mod normal, se obţine o cantitate mare de uroporfirinogen III (care este precursor al protoporfirinei IX) şi puţin uroporfirinogen I. Se pare însă că mai întâi se sintetizează numai uroporfirinogen I de la care, prin deschiderea ciclului, "răsturnarea" pirolului IV şi reciclizare s-ar obţine uroporfirinogenul III.

Transformarea uroporfirinogenului III în protoporfirină IX se face printr-o serie de reacţii de decarboxilare şi dehidrogenare. Mai întâi se decarboxilează cele patru resturi de acid acetic (poziţiile 1, 3, 5 şi 8) sub acţiunea uroporfirinogen decarboxilazei formându-se coproporfirinogenul III; acesta trece în mitocondrie, compartiment în care se desfăşoară toate reacţiile următoare care asigură formarea protoporfirinei IX, dar şi unirea acesteia cu Fe^{2+}. În primul rând resturile de acid propionic de la nucleele I şi II (poziţiile 2 şi 4) sunt decarboxilate, radicalii etil rezultaţi fiind dehidrogenaţi oxidativ la radicali vinil, reacţii catalizate de aceeaşi enzimă, coproporfirinogen oxidaza. Produsul

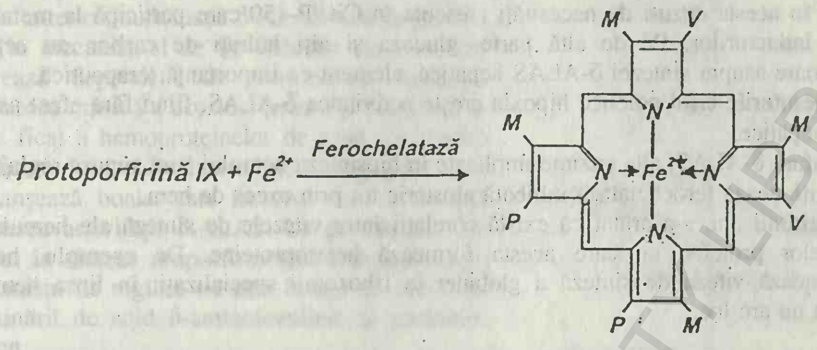
BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

la radicali vinil, reacţii catalizate de aceeaşi enzimă, coproporfirinogen oxidaza. Produsul este protoporfirinogenul IX care mai are încă nucleele pirolice unite prin punţi metilenice (din lipsa unei conjugări electronice extinse acest compus, ca de altfel şi cei precedenţi, este incolor). Protoporfirinogen oxidaza determină dehidrogenarea protoporfirinogenului IX la protoporfirina IX (care este colorată ca urmare a conjugării electronice extinse). Aceste transformări sunt:



În celule, formarea hemului prin complexarea protoporfirinei IX cu Fe^{2+} este catalizată de hemsintetază numită şi ferochelatază. În vitro această complexare are loc şi neenzimatic dar cu viteză mică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Hem (protohem)

X.2.2. REGLAREA BIOSINTEZEI HEMULUI

Pe parcursul şirului de reacţii ale biosintezei hemului sunt mai multe puncte de control. Cel mai important se realizează, firesc, la nivelul enzimei δ-ALAS, care este comtrolată pe cale dublă:

a) prin mecanism alosteric, modulatorul negativ principal fiind produsul final, hemul. Rglarea alosterică este favorizată de desfăşurarea în acelaşi compartiment (mitocondrie) a primelor şi ultimelor reacţii din calea de sinteză;

b) prin inducţie-represie, mecanism prioritar dovedit printre altele şi prin timpul de înjumătăţire mic al δ-ALAS (60-80 minute pentru cea din ficat). Sinteza este indusă prin scăderea concentraţiei hemului în timp ce represia prin creşterea peste limitele normale a concentraţiei acestuia; la represie participă şi un aporepresor, evident o proteină, de care hemul se leagă (Fig. X.4).

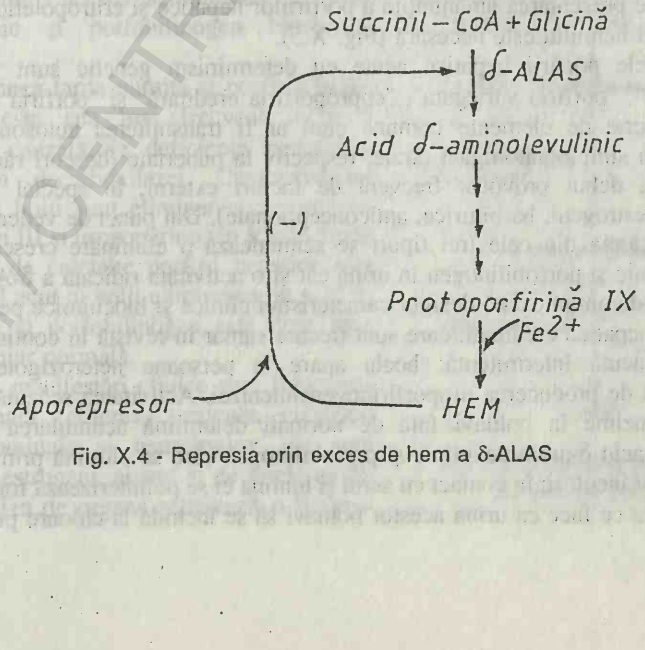


Fig. X.4 - Represia prin exces de hem a δ-ALAS

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O serie de alţi compuşi exogeni sau endogeni au acţiune inductoare asupra δ-ALAS hepatice: barbiturice, insecticide, sulfamide, hormoni estrogeni. Se crede că inducţia este legată în aceste cazuri de necesităţi crescute în Cit. P-450 care participă la metabolizarea inductorilor. Pe de altă parte, glucoza şi alţi hidraţi de carbon au acţiune represoare asupra sintezei δ-ALAS hepatice, element cu importanţă terapeutică.

În ţesuturile eritropoietice hipoxia creşte activitatea δ-ALAS, fiind fără efect asupra celei hepatice.

În afara δ-ALAS, alte enzime implicate în biosinteza hemului sunt supuse reglajului; se menţionează ferochelataza inhibată alosteric tot prin exces de hem.

În ultimii ani, s-a arătat că există corelaţii între vitezele de sinteză ale hemului şi diferitelor proteine cu care acesta formează heteroproteine. De exemplu, hemul influenţează viteza de sinteză a globinei în ribozomii specializaţi; în lipsa hemului sinteza nu are loc.

X.2.3. PORFIRIILE

Reglarea deosebit de eficientă a biosintezei hemului asigură inclusiv producerea intermediarilor în cantităţi dictate strict de necesităţile de moment ale organismului viu. De aceea, în condiţii fiziologice, cantităţile în exces de astfel de intermediari, care se elimină prin urină sau fecale, sunt foarte mici.

Deficienţele enzimtice diverse determină stări patologice caracterizate prin eliminarea crescută a unora dintre intermediarii din biosinteza hemului; aceste stări poartă numele comun de porfirii. Porfiriile cauzate de defecte enzimatice ereditare se numesc primare; cu o excepţie, fiecare porfirie primară este cauzată de sinteza deficitară a unei singure enzime din toate cele implicate în sinteza hemului. Porfiriile secundare sunt consecutive altor afecţiuni ca de exemplu intoxicaţiile sau diabetul cu acidoză.

Deşi în majoritatea tipurilor de porfirii defectul enzimatic este prezent în mai multe ţesuturi, consecinţele se manifestă prioritar la nivelul unora dintre acestea. Mai frecvente sunt porfiriile hepatice, porfiriile eritropoietice, uneori mixte (eritropoietice+hepatice).

Înainte de prezentarea amănunţită a porfiriilor hepatice şi eritropoietice o sumarizare a biosintezei hemului este necesară (Fig. X.5).

Principalele porfirii hepatice acute cu determinism genetic sunt "porfiria acută intermitentă", "porfiria variegata", "coproporfiria ereditară" şi "porfiria cutanea tarda". Ele au o serie de elemente comune cum ar fi transmiterea autosomal dominantă, manifestarea simptomatologică târzie, respectiv la pubertate (deseori rămânând latentă toată viaţa), debut provocat frecvent de factori externi, în special medicamentoşi (sulfamide, estrogeni, barbiturice, anticoncepţionale). Din punct de vedere biochimic, la debutul oricăreia din cele trei tipuri se semnalează o eliminare crescută de acid δ-aminolevulinic şi porfobilinogen în urină cât şi o activitate ridicată a δ-ALAS hepatice. Pe acest fond comun există desigur caracteristici clinice şi biochimice pentru fiecare tip de porfirie hepatică ereditară, care sunt trecute sumar în revistă în continuare.

Porfiria acută intermitentă: boala apare la persoane heterozigote pentru gena responsabilă de producerea uroporfirinogensintetazei. Activitatea scăzută cu circa 50% a acestei enzime la bolnavi faţă de normali determină acumularea unor cantităţi crescute de acid δ-aminolevulinic şi porfobilinogen care se elimină prin urină. Cei doi compuşi sunt incolori; în contact cu aerul şi lumina ei se polimerizează formând compuşi coloraţi, ceea ce face ca urina acestor bolnavi să se închidă la culoare prin şedere.

Curent se semnalează creşterea activităţii δ-ALAS hepatice în fazele acute ale bolii. Cum s-a arătat anterior, activitatea δ-ALAS este controlată şi prin mecanismul de tip inducţie-represie care operează dependent de concentraţia hemului. Utilizarea masivă a acestuia pentru producerea de către ficat a hemoproteinelor de tipul Cit P-450, implicate în metabolizarea medicamentelor care declanşează boala, este factorul care determină creşterea activităţii δ-ALAS. La persoanele fără defect în sinteza uroporfirinogen sintetazei acest mecanism de reglare nu este însoţit de creşterea eliminării de acid δ-aminolevulinic şi porfobilinogen.

De curând s-a arătat că în porfiria acută intermitentă se încadrează şi cazurile, foarte rare, în care defectul enzimatic este la nivelul porfobilinogen sintetazei.

Simptomele clinice ale bolii sunt variate: dureri abdominale cu vărsături, paralizii periferice ce pot cuprinde musculatura respiratorie. Cauza durerilor abdominale este sigur o perturbare a inervaţiei vegetative care la nivelul intestinului se manifestă prin peristaltism necontrolat, cu spasme şi dilataţii. Tulburările la nivelul sistemului nervos periferic duc la pareze şi paralizii; leziunile în sistemul nervos central duc, după localizare, la Parkinson, psihoze, depresii, halucinaţii. Cercetările recente atestă că, cel puţin la nivelul sistemului nervos, acumularea de acid δ-aminolevulinic şi porfobilinogen blochează ATP-aza Na-K.

Porfiria cutanea tarda numită şi porfiria hepatică cronică este cea mai frecvent întâlnită porfirie. Este cauzată de deficienţa parţială a uroporfirinogen decarboxilazei. Caracteristicile biochimice ale bolii sunt eliminarea crescută de uroporfirinogen III şi uroporfirinogen I; principala deosebire faţă de celelalte porfirii hepatice este că şi la debutul acut al bolii eliminarea de acid δ-aminolevulinic şi porfobilinogen este doar uşor crescută sau chiar normală.

Principalele manifestări clinice sunt fotosensibilitatea cutanată (eriteme, vezicule, cicatrici) tulburări abdominale şi neurologice; ele sunt exacerbate de estrogeni, alcool şi de unele medicamente. Analiza de organe reliefează o fluores-

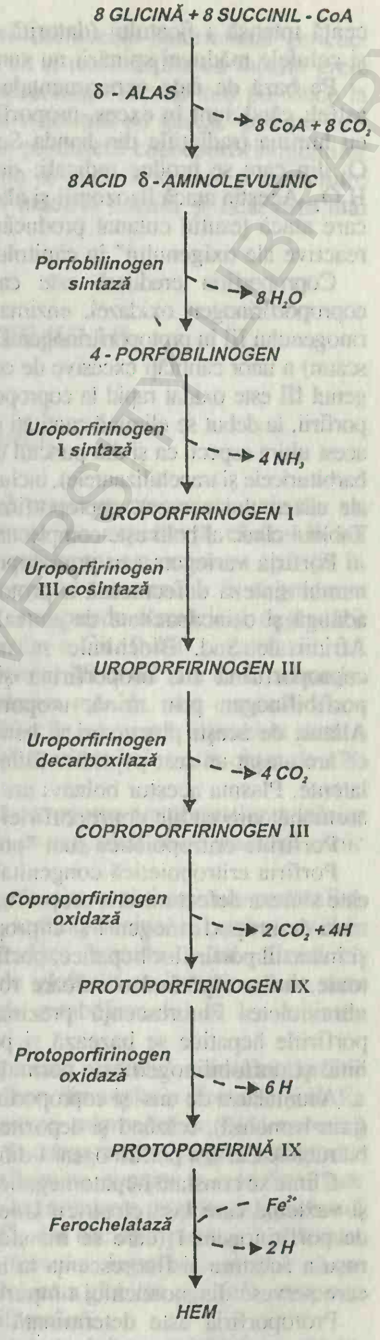


Fig. X.5 - Schema generală a biosintezei hemului

cență intensă a ficatului (datorită cantităților mari de porfirine) în timp ce eritrocitele și celulele măduvei spinării nu sunt fluorescente.

Pe bază de date experimentale recente, fotosensibilitatea cutanată este interpretată astfel: când sunt în exces, uroporfirinogenii I și III difuzează în piele unde în contact cu lumina (radiațiile din banda Soret) trec în stări excitate capabile să reacționeze cu O_2 din care se produc radicali: -ionul superoxid (O_2^-), hidroxil ($\cdot OH$) și alții, inclusiv H_2O_2. Aceștia atacă lizozomii și alte organite celulare; din lizozomi se eliberează enzime care atacă țesutul cutanat producându-se efectele menționate mai înainte (vezi "Specii reactive ale oxigenului" în capitolul de energetică biochimică).

Coproporfiria ereditară este cauzată de defectul enzimatic ereditar în biosinteza coproporfirinogen oxidazei, enzima mitocondrială care catalizează conversia coproporfirinogenului III în protoporfirinogen IX. Se caracterizează prin eliminare renală (mai puțin prin scaun) a unor cantități excesive de coproporfirinogen III. În contact cu aerul, coproporfirinogenul III este oxidat rapid la coproporfirina III, care este colorată în roșu. Și în cazul acestei porfirii, la debut se elimină cantități crescute de acid δ-aminolevulinic și porfobilinogen. Sub acest ultim aspect, ca și din punctul de vedere al debutului (administrarea de medicamente ca barbituricele și tranchilizantele), inclusiv a manifestărilor clinice (dureri abdominale și afecțiuni ale sistemului nervos), coproporfiria ereditară se aseamănă cu porfiria acută intermitentă. Tabloul clinic al bolii este complectat însă cu fotosensibilitatea cutanată.

Porfiria variegata sau protocoproporfiria ereditară are drept cauză, după unii autori, numai sinteza defectuoasă a protoporfirinogen oxidazei. După alții, la acest defect se adaugă și o incapacitate de sinteză a ferochelatazei. Boala apare rar și numai în zona Africii de Sud. Biochimic se manifestă prin excreția excesivă de protoporfirină, coproporfirină III, uroporfirina și - numai la debut - de acid δ-aminolevulinic și porfibilinogen prin urină, uroporfirină, coproporfirină și protoporfirină prin fecale. Alături de acești precursori ai hemului apare și o porfirină atipică, notată X, hidrofilă, ce are atașat un rest peptidic. Eliminarea de intermediari este uneori crescută și în stări latente. Plasma acestor bolnavi are o fluorescență roșie intensă. Simptomele clinice sunt asemănătoare cu ale coproporfiriei ereditare, inclusiv fotosensibilitatea cutanată.

Porfiriile eritropoietice sunt "porfiria eritropoietică congenitală" și "protoporfiria".

Porfiria eritropoietică congenitală este o boală rară, al cărei defect metabolic primar este sinteza defectuoasă a uroporfirinogen III cosintetazei. Ca urmare, se produc cantități mari de uroporfirinogen I și coproporfirinogen I care se elimină prin urină și fecale. Ca și în cazul porfiriilor hepatice, porfirinogenii se oxidează rapid la porfirinele corespunzătoare, urina căpătând o culoare roșie și prezentând fluorescență sub acțiunea radiației ultraviolete. Fluorescență prezintă și eritrocitele. Diagnosticul diferențial față de porfiriile hepatice se bazează și pe faptul că eliminarea urinară de acid δ-aminolevulinic și porfobilinogen este normală.

Acumularea de uro- și coproporfirinogen I în eritrocite diminuă durata de viață a acestora (prin hemoliză), scăzând și depozitele eritrocitare din măduva osoasă. Crește eliminarea de bilirubină. Cei doi porfirinogeni I difuzează în țesuturi, în special în piele, cartilaje și rinichi.

Clinic se constată hepatomegalie, fotosensibilitate foarte mare cu producere de eriteme și vezicule care lasă cicatrici. Uneori apar deformații la față și mâini. Depozitele mari de porfirinogeni I (care se transformă în porfirine I) din dinți determină colorarea în roșu a acestora și fluorescența la iradieri cu ultraviolete; acestea sunt alte caracteristici care servesc diagnosticului timpuriu al bolii.

Protoporfiria este determinată de deficiența sintezei ferochelazei și este asociată chimic cu producerea de urticarii în urma expunerii la lumină. Eritrocitele, plasma și fecalele conțin cantități mari de protoporfirina IX, iar reticulocitele (eritrocitele tinere) și pielea prezintă fluorescență roșie.

Coproporfiriile secundare sunt mult mai frecvente decât cele determinate genetic. Multe boli între care hepatitele, anemia pernicioasă, ca şi intoxicaţiile cu metale grele (plumb) sau cu substanţe organice (benzen, alcool, tetraclorură de carbon) pot duce la eliminări crescute de porfirine. În bolile hepatice cu colestază se găsesc deseori uro- şi coproporfirinogenii de tip I. În general, mecanismele producerii coproporfirinogeniilor secundare nu sunt cunoscute. În intoxicaţiile cu plumb se pare că are loc o substituire a fierului cu plumbul. După caz, sinteza hemului în măduva osoasă şi ficat este mai mult sau mai puţin perturbată.

X.3 CATABOLISMUL HEMULUI

X.3.1. ETAPELE INIŢIALE

Hemul din diferitele hemoproteine se catabolizează printr-un mecanism unic dar cu viteze diferite în primele etape. La om şi la animale de experienţă cărora li s-a administrat glicină sau acid δ-aminolevulinic marcaţi radioactiv s-a constatat apariţia în timp a două maxime de producere a bilirubinei, principalul intermediar în degradarea hemului. Primul maxim apare la circa trei zile şi el corespunde formării şi degradării parţiale a hemoproteinelor nehemoglobinice, în particular a Cit. P-450 şi catalazei; cel de al doilea maxim apare în cazul şobolanilor în intervalul 40 la 80 zile de la administrarea precursorilor radioctivi ai hemului. La om, al doilea maxim, care cuprinde circa 75% din radioctivitatea administrată, apare după 120 zile. Această bilirubină derivă numai din degradarea Hb ştiut fiind că durata de viaţă a eritrocitelor este chiar de 120 zile.

Catabolismul hemoglobinei eritrocitare începe odată cu ruperea membranelor celulelor îmbătrânite. Corespunzător celulelor care se distrug, la un om adult se degradează zilnic în jur de 6 g Hb, respectiv 300 mg hem.

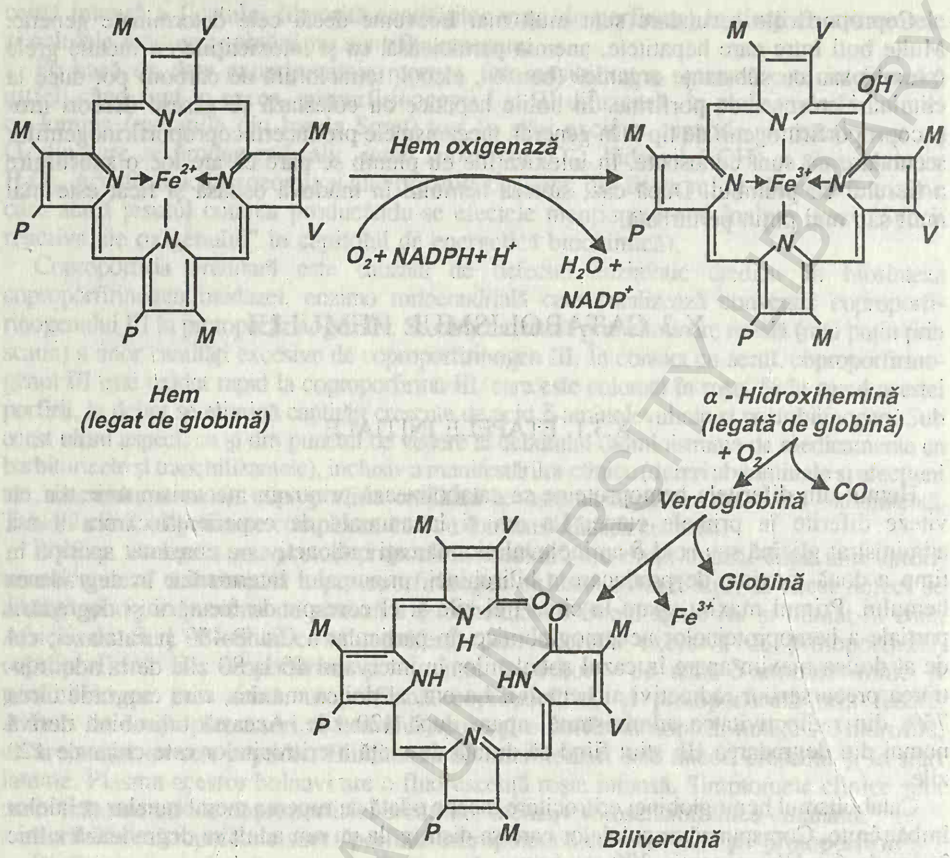
Hb eliberată în plasmă este fagocitată de macrofagele sistemului reticulo-endotelial, în special ale ficatului, splinei şi ganglionilor limfatici, sediul principal al catabolismului.

Există controverse referitoare la începerea degradării hemului; unii afirmă că procesul are loc numai după desprinderea acestuia de globină; mai susţinută de date experimentale este interpretarea că primele reacţii ale catabolismului au loc înaintea desprinderii hemului de componenta proteică.

Primele reacţii ale degradării conduc la deschiderea pe cale oxidativă a inelului porfinic din hem; oxidarea se face la carbonul metinic α şi carbonii α din nucleele pirolice I şi II. Ea se realizează cu O_2 sub acţiunea catalitică a hemoxigenazei microzomiale fiind necesară prezenţa NADPH şi a Cit. P 450, ultimul în calitatea lui de component al lanţului transportor de electroni microzomial. Intermediar se obţine α-hidroxihemina, compus în care fierul este în stare oxidată, Fe^{3+}; sub acţiunea în continuare a O_2 are loc scindarea propriu-zisă, carbonul metinic fiind eliminat sub formă de CO iar atomii de C_α din nucleele pirolice I şi II sunt oxidaţi la grupări carbonil. Compusul aciclic oxidat al hemului, legat încă de globină, se numeşte verdoglobină. Urmează desprinderea din verdoglobină a globinei şi a Fe^{3+}; compusul tetrapirolic aciclic oxidat, care devine liber, se numeşte biliverdină.

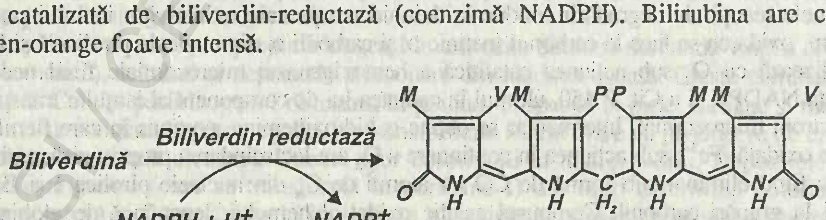
Globina eliberată poate fi reutilizată pentru sinteza hemului sau este hidrolizată la aminoacizi. Fierul va fi utilizat imediat pentru biosinteza de hem sau va fi depozitat sub formă de feritină ori siderofilină.

BOTOŞANI COUNTY LIBRARY



X.3.2. BILIRUBINA: FORMARE, PĂTRUNDERE ÎN FICAT, CARACTERISTICI, CONJUGARE, EXCREŢIE BILIARĂ

Catabolismul hemului continuă cu reducerea biliverdinei la bilirubină; această reacţie este catalizată de biliverdin-reductază (coenzimă NADPH). Bilirubina are culoare galben-orange foarte intensă.



Deoarece bilirubina este cel mai important dintre intermediarii degradării hemului structura şi proprietăţile ei au fost intens studiate. În comparaţie cu biliverdina, bilurubina este mai puţin polară la pH-ul fiziologic. Pe baza datelor obţinute la difracţia

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

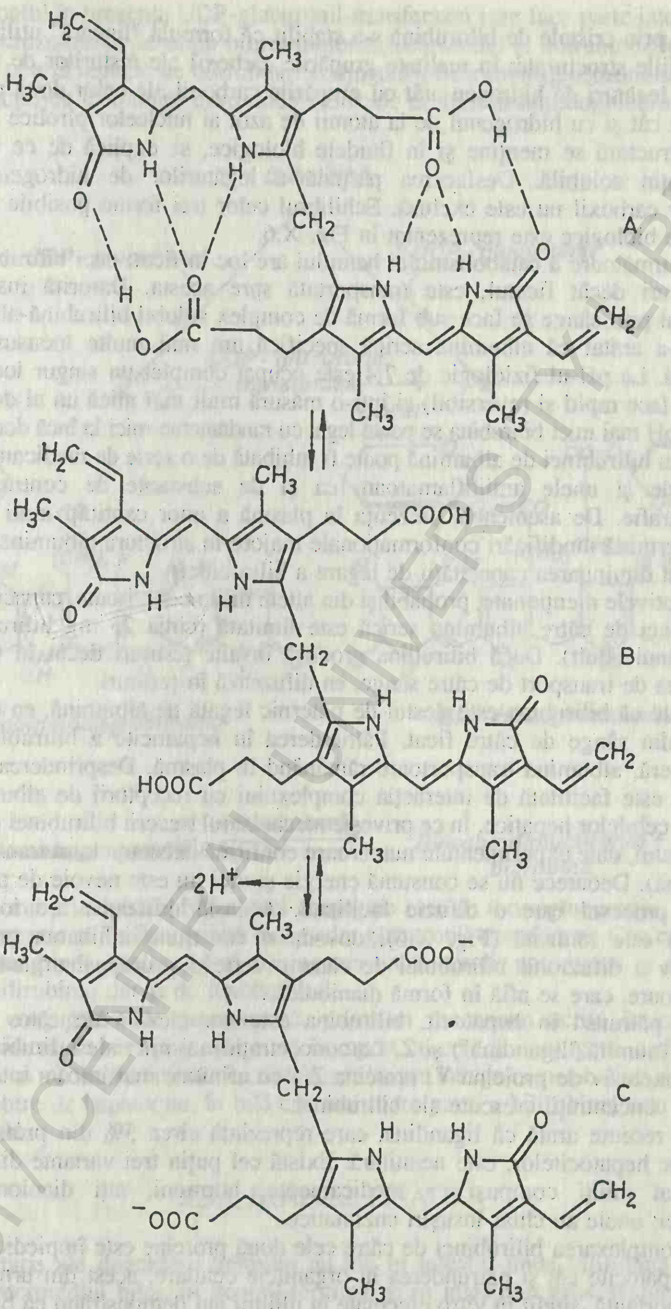


Fig. X.6 - Stările posibile ale bilirubinei în fluidele biologice:
A - asociată prin legături de hidrogen interne; B - cu legăturile de hidrogen desfăcute; C - sub formă de dianion

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

razelor X prin cristale de bilurubină s-a stabilit că formula "lineară" utilizată curent nu redă detaliile structurale; în realitate grupările carboxil ale resturilor de acid propionic formează legături de hidrogen atât cu grupările carbonil ale celor două nuclee pirolice marginale cât şi cu hidrogenul de la atomii de azot ai nucleelor pirolice centrale. Dacă această structură se menţine şi în fluidele biologice, se explică de ce bilirubina este foarte puţin solubilă. Desfacerea parţială a legăturilor de hidrogen şi ionizarea grupărilor carboxil nu este exclusă. Echilibrul celor trei forme posibile ale bilirubinei în mediile biologice este reprezentat în Fig. X.6.

Etapa următoare a catabolismului hemului are loc în ficat; deci bilirubina formată în alte ţesuturi decât ficatul, este transportată spre acesta. Datorită insolubilităţii ei, transportul prin sânge se face sub formă de complex solubil bilirubină-albumină serică. Recent s-a arătat că albumina serică specifică are mai multe locusuri de legare a bilirubinei. La pH-ul fiziologic de 7,4 este ocupat complet un singur locus (legarea la acesta se face rapid şi reversibil) şi într-o măsură mult mai mică un al doilea locus. La valori de pH mai mici bilirubina se poate lega, cu randamente mici la încă două locusuri.

Legarea bilirubinei de albumină poate fi inhibată de o serie de medicamente cum sunt sulfamidele şi unele antiinflamatoare ca şi de substanţe de contrast utilizate în colangiografie. De asemenea, prezenţa în plasmă a unor cantităţi mari de acizi graşi liberi determină modificări conformaţionale majore în structura albuminei serice, având ca rezultat diminuarea capacităţii de legare a bilirubinei.

Din motivele menţionate, probabil şi din altele încă necunoscute, capacitatea de legare a bilirubinei de către albumina serică este limitată (circa 25 mg bilirubină legată în sângele unui adult). Dacă bilirubina produsă în alte ţesuturi decât în ficat depăşeşte capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în ţesuturi.

Cu toate că bilirubina este destul de puternic legată de albumină, ea este extrasă cu uşurinţă din sânge de către ficat. Pătrunderea în hepatocite a bilirubinei se face în formă liberă, albumina transportoare rămânând în plasmă. Desprinderea bilirubinei de albumină este facilitată de interacţia complexului cu receptorii de albumină situaţi la suprafaţa celulelor hepatice. În ce priveşte mecanismul trecerii bilirubinei prin membrana hepatocitului, date experimentale numeroase confirmă existenţa unui transportor specific (o proteină). Deoarece nu se consumă energie şi nici nu este nevoie de prezenţa ionilor de Na^+, procesul este o difuzie facilitată. Această difuziune are loc numai dacă bilirubina este ionizată (Fig. X.6); dovada o constituie inhibarea printr-un proces competitiv a difuziunii bilirubinei de către o serie de compuşi organici cu structuri asemănătoare, care se află în formă dianionică.

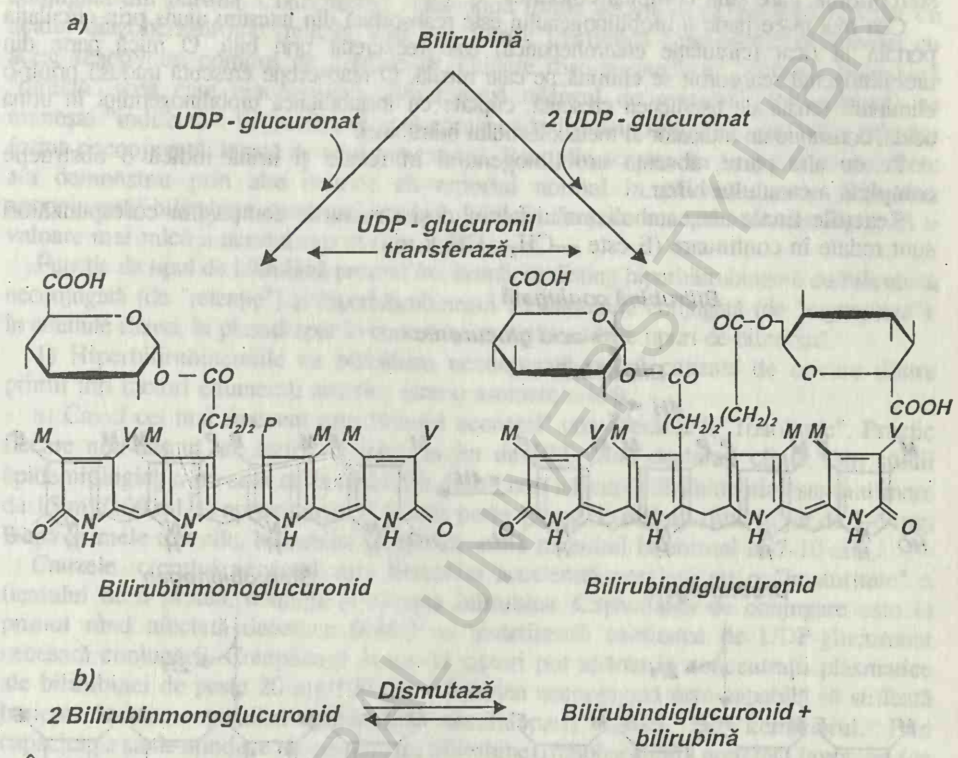
Odată pătrunsă în hepatocit, bilirubina este complexată de către două proteine notate Y (numită "ligandină") şi Z. La concentraţii mai mici ale bilirubinei ea se leagă aproape exclusiv de proteina Y, proteina Z - cu afinitate mai mică - intrând în acţiune numai la concentraţii crescute ale bilirubinei.

Studii recente arată că ligandina, care reprezintă circa 5% din proteinele citoplasmatice ale hepatocitelor, este neunitară. Există cel puţin trei variante dintre care unele leagă mai mulţi compuşi ca medicamente, hormoni, alţi dianioni asemănători bilirubinei; unele au chiar însuşiri enzimatice.

Prin complexarea bilirubinei de către cele două proteine este împiedicată atât ieşirea ei din hepatocite cât şi pătrunderea în organitele celulare; acest din urmă aspect are o mare importanţă, studii în vitro efectuate în ultimii ani demonstrând că bilirubina inhibă respiraţia mitocondrială, efect complet prevenit de prezenţa ligandinei.

În vederea excreţiei biliare a bilirubinei, ea este trecută din nou într-o formă solubilă; de această dată are loc esterificarea unuia sau ambelor resturi propionil cu acidul glucuronic. Introducerea radicalilor glucuronil se face prin reacţia bilirubinei cu

UDP-glucuronatul în prezenţa UDP-glucuronil-transferazei care face parte integrantă din membrana microzomială. Se obţin bilirubinmonoglucuronidul şi bilirubindiglucuronidul care la un loc poartă numele de bilirubina "conjugată". Bilirubindiglucuronidul se obţine şi printr-o reacţie de dismutare între două molecule de bilirubinmonoglucuronid:



În ficat forma principală a bilirubinei conjugate este de monoglucuronid.

În prezent se ştie că în ficat există mai multe glucuronil transferaze. Cea care asigură conjugarea bilirubinei catalizează şi conjugarea unor steroli; activitatea ei este indusă de substrat (bilirubina) dar şi de fenobarbital.

Bilirubina conjugată este transportată, printr-un mecanism activ, în canaliculele biliare. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare, astfel încât ea se constituie ca un mecanism limitativ cu răsfrângere asupra întregului metabolism al bilirubinei.

Spre deosebire de hepatocite, în bilă cea mai mare parte a bilirubinei este sub formă de diglucuronid.

X.3.3. ETAPELE FINALE

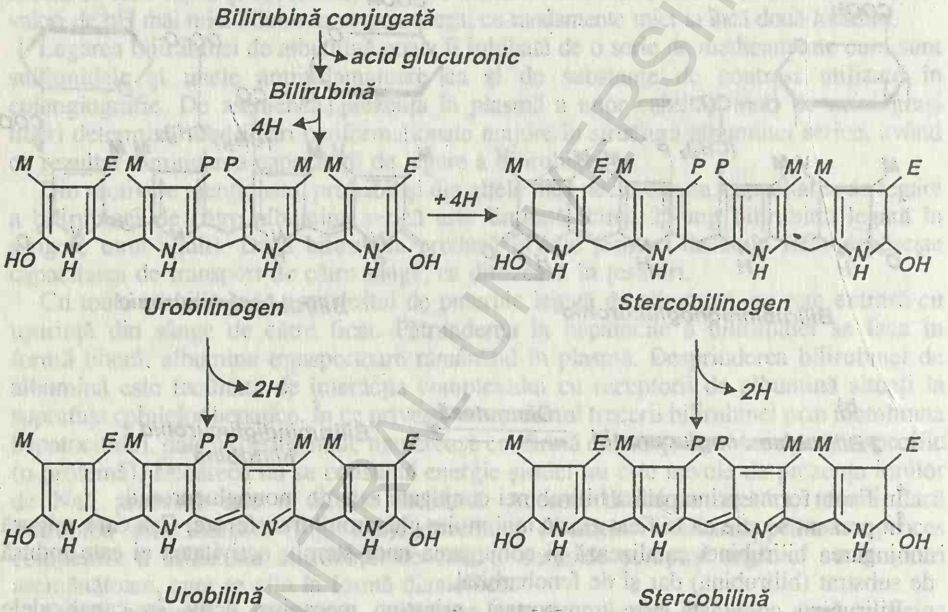
Ultimele etape ale degradării hemului au loc în intestin unde bilirubina conjugată ajunge prin intermediul bilei. În ileonul terminal şi în intestinul gros, resturile de acid glucuronic sunt îndepărtate sub acţiunea β-glucuronidazei produsă de bacteriile intestinale; bilirubina liberă este supusă unor reacţii de reducere succesive catalizate de reductaze produse tot de bacterii. Primul compus obţinut prin reducere, care datorită

lipsei conjugării nu are culoare, este urobilinogenul (mezobilirubinogen). O parte mică din urobilinogen este redus în continuare la stercobilinogen, de asemenea, incolor. Stercobilinogenul şi în mică măsură urobilinogenul sunt eliminaţi prin fecale. În contact cu aerul ei se oxidează parţial (dehidrogenează) trecând în urobilină, respectiv stercobilină, care sunt compuşi coloraţi.

Cea mai mare parte a urobilinogenului este reabsorbită din intestin; ajuns prin circulaţia portală la ficat (circulaţie enterohepatică) este reexcretat prin bilă. O mică parte din urobilinogenul reabsorbit se elimină pe cale renală. O reabsorbţie crescută tradusă printr-o eliminare renală de asemenea crescută, cuplate cu instabilitatea urobilinogenului în urina acidă, constituie un indicator al metabolismului bilirubinei.

Pe de altă parte, absenţa urobilinogenului în fecale şi urină indică o obstrucţie completă a canalului biliar.

Reacţiile finale ale catabolismului hemului şi structurile compuşilor corespunzători sunt redate în continuare (E este $—CH_2—CH_3$):



X.3.4. HIPERBILIRUBINEMIILE

La om, concentraţia normală a bilirubinei serice totale este cuprinsă între limitele 0,4-1 mg/100 ml. Nu se cunosc cazuri de scădere marcată a bilirubinei sub limita inferioară. În schimb, sunt frecvente cazurile depăşirii limitei superioare; în aceste situaţii bilirubina din sânge trece în ţesuturi. Colorarea intensă în galben a pielii şi mucoaselor este un semnal clinic primar al acestor stări cunoscute sub numele comun de icter.

Cauzele depăşirii nivelului normal al bilirubinei serice sunt diverse:

- creşterea vitezei de formare a bilirubinei (deci a degradării hemoproteinelor);
- scăderea capacităţii de captare a bilirubinei de către ficat;
- scăderea capacităţii ficatului de a conjuga bilirubina;
- perturbarea mecanismului eliminării prin bilă;
- tulburări extrahepatice ale fluxului biliar.

Patologia metabolismului bilirubinei este complexă deoarece, frecvent, acţionează simultan mai mulţi dintre factorii enumeraţi.

Înainte de prezentarea principalelor forme de icter se face precizarea că din punct de vedere clinic este deosebit de important raportul bilirubină neconjugată/bilirubină conjugată din plasmă. Concentraţia celor două forme se stabileşte pe baza reacţiei cu acidul diazobensulfonic (reacţia Van den Berg); fracţiunea care formează imediat cu acest reactiv un compus de cuplare de culoare roşu-purpuriu se numeşte bilirubină "directă", cea care reacţionează numai după adaosul de metanol (sau acetonă) se numeşte "indirectă". Bilirubina directă corespunde formei conjugate, cea indirectă este forma neconjugată, legată de albumina serică. Reacţiile acestea nu sunt foarte specifice; s-a demonstrat prin alte metode că raportul normal în plasmă pentru bilirubina neconjugată/ bilirubina conjugată este de 30/1 în timp ce reacţia Van der Berg dă o valoare mai mică a acestui raport (circa 10/1).

Funcţie de tipul de bilirubină prezent în plasmă, se disting hiperbilirubinemii cu bilirubină neconjugată (de "retenţie") şi hiperbilirubinemii cu bilirubină conjugată (de "regurgitare"); în anumite cazuri, în plasmă apar în concetraţii crescute ambele tipuri de bilirubină.

1) Hiperbilirubinemiile cu bilirubina neconjugată pot fi cauzate de oricare dintre primii trei factori enumeraţi anterior (sau o asociere a lor).

a) Cazul cel mai frecvent este "icterul neonatal" considerat a fi "fiziologic". Practic fiecare nou-născut are astfel de icter, în jur de 50% fiind declaraţi clinic. Din studii epidemiologice a rezultat că la circa 5% dintre nou născuţi bilirubinemia este mai mare de 15 mg/100 ml, la aproximativ 16% este peste 10 mg, la ceilalţi fiind în jur de 5-6 mg. După primele trei zile, bilirubina începe să scadă revenind la normal în 7-10 zile.

Cauzele icterului neonatal sunt hemoliza accelerată corelată cu o "imaturitate" a ficatului de a prelua, conjuga şi excreta bilirubina. Capacitatea de conjugare este în primul rând afectată deoarece ficatul nu sintetizează cantitatea de UDP-glucuronat necesară conjugării. Complicaţii în aceste cazuri pot apărea la concentraţii plasmatice ale bilirubinei de peste 20 mg/100 ml; bilirubina neconjugată este capabilă să străbată bariera hemato-encefalică producând encefalopatia toxică sau kernicterul. Prin capacitatea sa de a induce metabolizarea bilirubinei, fenobarbitalul are efect favorabil (ca de altfel şi în alte forme de icter).

b) Sindromul Crigler-Najjar de tip I este o boală ce se datorează unui defect genetic cu transmitere autosomal recesivă; defectul constă în incapacitatea ficatului de a sintetiza UDP-glucuronil transferaza specifică pentru conjugarea bilirubinei. Cum s-a arătat, eliminarea bilirubinei prin bilă nu se poate face decât sub formă conjugată. De aceea, bilirubina se acumulează în sânge unde concentraţia rămâne ridicată (de regulă peste 20, uneori ajungând la 50 mg/100 ml ser). Eliminarea de urobilinogen este foarte redusă. Funcţiile ficatului, inclusiv conjugările altor compuşi nu sunt alterate.

Pătrunderea bilirubinei în sistemul nervos central cauzează modificări profunde (kernicter), determinând moartea în perioada neonatală. Se citează totuşi cazuri de supravieţuire până în jur de 20 ani.

Fenobarbitalul, în calitatea lui de inductor al metabolismului bilirubinei, este fără efect în acest sindrom. Oarecare efecte are fototerapia ($\lambda = 425\text{-}475$ nm); se pare că prin iradiere bilirubina este fragmentată în compuşi polari, eliminabili pe cale renală.

c) În sindromul Crigler-Najjar de tip II defectul ereditar în sinteza UDP-glucuronil transferazei (transmitere autosomal dominantă) este numai parţial. O complicaţie (tot de natură genetică) pare a fi conjugarea bilirubinei la bilirubin diglucuronid. În sânge se

află, de asemenea, numai bilirubina liberă dar concentrația acesteia nu depășește 20 mg/100 ml ser. Tabloul clinic este mai puțin sever față de sindromul Crigler-Najjar de tip I. În primul rând semnele nu apar decât în tinerețe și la adult. Nu apar complicații la nivelul sistemului nervos central. Pe de altă parte, doze mari de fenobarbital ameliorează boala fiind stimulate creșterea depozitului de bilirubină în ficat, sinteza de proteine Y și Z, creșterea fluxului biliar.

d) Sub denumirea de boala lui Gilbert sunt cuprinse un grup heterogen de tulburări ale captării bilirubinei de către ficat și ale mecanismului de preluare a bilirubinei conjugate de către canaliculele biliare. În unele cazuri aceste tulburări sunt însoțite de o activitate scăzută a UDP-glucuronil transferazei, în altele de o durată de viață mai mică a eritrocitului, deci o producție suplimentară de bilirubină. Au fost semnalate mutații în secvența proteinelor Y și Z și modificări în capacitatea de ionizare a bilirubinei. În medie, bilirubina serică nu depășește 3 mg/100 ml dar există fluctuații destul de însemnate; la acești bolnavi, creșteri peste valoarea medie se semnalează în stresuri diverse, exerciții fizice, în înfometare (după circa 48 ore). Patogenaza acestor procese nu este complet lămurită.

e) Bilirubina liberă din ser crește de asemenea, în intoxicații diverse ("hiperbilirubinemia toxică"): cu cloroform, tetraclorură de carbon etc.

2) Hiperbilirubinemii cu bilirubina conjugată:

a) În icterul numit "obstructiv" acumularea bilirubinei conjugate în sânge și difuzarea ei în țesuturi este urmarea blocării parțiale sau totale a canalelor biliare; mai frecvent blocarea se produce prin formarea de calculi (litiaza biliară), cazurile mai rare fiind datorate tumorilor sau congestiilor în această zonă. Dacă obstrucția canalului biliar este totală, în intestin nu se mai află urobilinogen, scaunul este decolorat. Acești derivați ai bilirubinei nu se elimină nici prin urină. Nu sunt încă pe deplin cunoscute mecanismele prin care bilirubina conjugată trece din canalele biliare sau celulele hepatice în fluxul sanguin.

b) Icterul "idiopatic cronic" (sindromul Dubin-Johnson) este cauzat de un defect genetic transmisibil, al secreției bilirubinei conjugate (dar și alți compuși conjugați) din celulele hepatice în capilarele biliare. Bilirubina serică este în mod curent puțin crescută (2-5 mg/100 ml, rareori mai mult), dar din aceasta peste 50% este conjugată. Sindromul apare rareori înaintea pubertății. Culoarea ficatului este foarte închisă datorită formării unui pigment care este destul de asemănător melaninei.

c) Sindromul Rotor se deosebește numai parțial de sindromul Dubin-Johnson în sensul lipsei pigmentului brun din hepatocite.

3) Hiperbilirubinemii cu ambele forme de bilirubină:

a) Icterul "hemolitic" apare frecvent și la adulți. Distrucția anormală a eritrocitelor poate avea diverse cauze între care și anemia pernicioasă. Degradarea masivă a hemoglobinei este posibilă datorită inductibilității hemoxigenazei. Ca urmare crește bilirubina neconjugată din plasmă. Dacă hemoliza este foarte puternică, în plasmă (și deci în țesuturi) crește și bilirubina conjugată, deoarece, cum s-a arătat mai înainte, etapa limitantă de viteză în catabolismul hemului este reprezentată de trecerea bilirubinei conjugate din celulele hepatice în bilă. Degradarea masivă a hemoglobinei se traduce în acest caz și printr-o eliminare crescută de urobilinogen prin fecale și urină. Hemoliza avansată este compensată parțial printr-o intensificare a eritropoiezei în măduva osoasă.

b) Icterele "hepatocelulare" apar în suferințele hepatice diverse cum sunt hepatita acută virală, puseele evolutive ale hepatitelor cronice, hepatopatiile alcoolice și cirozele hepatice. În toate aceste cazuri sunt afectate atât captarea, glucuronoconjugarea cât și excreția bilirubinei. Raportul între bilirubina conjugată și cea din plasmă este diferit de

la o afecţiune la alta şi depinde în toate cazurile de gravitatea bolii. Cele mai mari creşteri ale bilirubinei totale se semnalează în hepatita acută virală, valoarea ei putând atinge chiar 20 mg/100 ml plasmă. În această boală paralelismul concentraţiei bilirubinei cu activitatea unor enzime serice (GOT, GPT şi GIDH) este evident: creşterea concentraţiei bilirubinei şi a activităţii acestor enzime în perioada de 10-14 zile de la debutul bolii şi revenirea treptată la normal după 6-8 săptămâni. Dacă hepatita virală este însoţită de fenomene colestatice pronunţate, scaunele devin palide şi urobilinogenul dispare din urină (în lipsa colestazei el este decelabil la acest nivel). Reapariţia urobilinogenului în urină coincide cu reluarea fluxului biliar şi reflectă începutul vindecării.

Creşterile bilirubinei în puseele hepatice cronice şi în ficatul gras de etiologie alcoolică sunt rareori peste 2-3 mg/100 ml plasmă; în ciroză, bilirubina totală variază între valoarea normală şi 3-4 mg/100 ml plasmă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. XI. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE ŞI PIRIMIDINICE

Nucleotidele purinice şi pirimidinice sunt biomolecule fundamentale pentru toate organismele vii, participând la procese esenţiale:

- sunt componente structurale ale acizilor nucleici, ARN şi ADN, macromolecule informaţionale;
- nucleozidele trifosforilate, în particular ATP, prin legăturile fosfat macroergice participă la tranzacţiile energetice celulare;
- nucleotidele ciclice, 3',5'-AMP şi 3',5'-GMP, au roluri reglatoare ale funcţiilor celulare, sunt mediatori ai mesajelor extracelulare;
- derivaţi ai nucleotidelor ca CDP-colină, CDP-digliceride, UDP-glucoză, UDP-glucuronat, sunt intermediari activi în procese biosintetice;
- coenzimele NAD, NADP, FAD, CoASH cuprind în structura lor şi un nucleotid cu adenină.

În Tabelul XI.1. sunt prezentate denumirile şi prescurtările celor mai importanţi compuşi din această clasă, baze, nucleozide şi nucleotide. În capitolele anterioare au fost tratate pe larg, structurile chimice şi funcţiile unora dintre nucleotidele purinice şi pirimidinice. În capitolul de faţă se va prezenta biosinteza, interconversiunile şi catabolismul acestora.

XI.1. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE

Rolul major al nucleotidelor purinice este acela de componente ale acizilor nucleici şi distribuţia purinelor (ca şi a pirimidinelor) în aceste macromolecule se realizează prin mecanisme genetice. Metabolismul general al organismului trebuie să asigure existenţa unui fond cuprinzând cantitatea şi varietatea de nucleotide necesare sintezei de ADN şi ARN. Acest fond se realizează:

- prin sinteza de novo a ribonucleotidelor;
- conversia parţială a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide;
- interconversiunile nucleotidelor;
- reutilizarea bazelor purinice, a nucleotidelor ce rezultă prin degradarea celulară a acizilor nucleici.

Toate celulele cuprind ARN şi pot reutiliza, după unele remanieri, produşii de degradare. Sinteza de novo are loc aproape în exclusivitate în ficat de unde produşii finali sau unii intermediari sunt preluaţi de către ţesuturile extrahepatice. Se pare că eritrocitele joacă un rol important în acest transfer. Fracţiunea de nucleotide purinice în exces faţă de nevoi este convertită în acid uric, catabolit final excretabil.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel XI.1.

Baze, nucleozide şi nucleotide purinice şi pirimidinice

Bază	Nucleozid (bază + riboză)	Nucleotid		
		Nucleozid monofosfat (NMP)	*Nucleozid difosfat (NDP)*	*Nucleozid trifosfat (NTP)*
Purină				
Adenină (6-amino-purină)	Adenozină	Acid adenilic, AMP	ADP	ATP
Guanină (2-amino-6-hidroxi-purină)	Guanozină	Acid guanilic, GMP	GDP	GTP
Hipoxantină (6-hidroxi-purină)	Inozină	Acid inozinic, IMP	-	-
Xantină (2,4-dihidroxi-purină)	Xantozină	Acid xantilic, XMP	XDP	XTP
Acid uric (2,4,8-trihidroxi-purină)	-	-		
Pirimidină				
Uracil (2,4-dihidroxi-pirimidină)	Uridină	Acid uridilic, UMP	UDP	UTP
Citozină (2-hidroxi-4-amino-pirimidină)	Citidină	Acid citidilic, CMP	CDP	CTP
Timină (2,4-dihidroxi-5-metil-pirimidină)	Timidină (cu dezoxiriboză)	Acid timidilic, TMP	TDP	TTP
Acid orotic (2,4-dihidroxi-pirimidin-6-carboxilat)	Orotidină	Acid orotidilic, OMP	-	-

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XI.1.1. BIOSINTEZA DE NOVO A NUCLEOTIDELOR PURINICE

Biosinteza IMP

Materiile prime pentru sinteza nucleului purinic sunt reprezentate de aminoacizii glicină, acid aspartic, glutamină, dioxid de carbon, unităţi C_1-tetrahidrofolat. Prin utilizarea de precursori marcaţi cu ^{15}N şi ^{14}C s-a stabilit originea fiecărui atom din nucleul purinic (Fig. XI.1). Totodată, aceste studii au demonstrat că păsările, mamiferele şi alte specii utilizează aceleaşi reacţii pentru sinteza nucleotidelor purinice. Riboza este furnizată de glucoză pe calea pentozofosfaţilor.

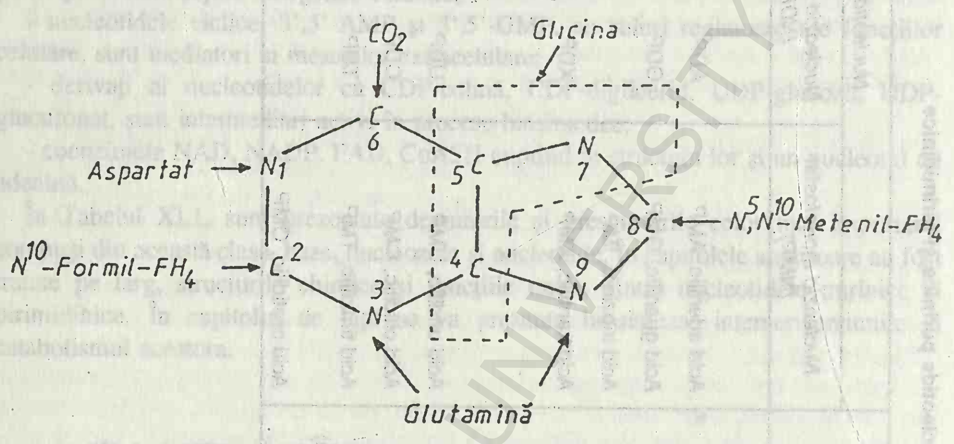


Fig. XI.1 - Precursorii nucleului purinic

În această cale biosintetică nu se formează baze purinice libere ci direct ribonucleotide. Legătura β-N-glicozidică se stabileşte cu mult înaintea constituirii nucleului heterociclic. Primul ribonucleotid al secvenţei de novo cuprinde baza purinică hipoxantina (6-hidroxi-purină) şi poartă denumirea de acid inozinic sau inozin monofosfat (IMP). De la IMP se obţin apoi nucleotidul cu adenină (AMP) şi cel cu guanină (GMP). În Fig. XI.2. este prezentată succesiunea de reacţii care, pornind de la 5-fosfo-riboză conduce la IMP.

Reacţia (1) constă în activarea restului ribozil la 5-fosforibozil-α-1-pirofosfat (PRPP), catalizată de PRPP sintetază. PRPP este un compus cheie în metabolismul nucleotidelor, este precursor şi al nucleotidelor pirimidinice. De asemenea, PRPP furnizează restul 5-P-ribozil şi în reacţiile de reciclare a bazelor purinice. PRPP sintetaza este supusă acţiunii reglatoare a diverşi factori.

Cu următoarea reacţie, (2), începe de fapt calea specifică sintezei purinelor. Gruparea amidică a glutaminei înlocuieşte restul pirofosfat din PRPP rezultând 5-fosforibozil-β-1-amină. De remarcat schimbarea $\alpha \longrightarrow \beta$ a configuraţiei C_1 al ribozei şi constituirea viitoarei legături β-N-glicozidică a nucleotidelor. Atomul de azot introdus este N_9 purinic. Enzima, amidofosforibozil transferaza, este cel de al doilea punct de control al secvenţei.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

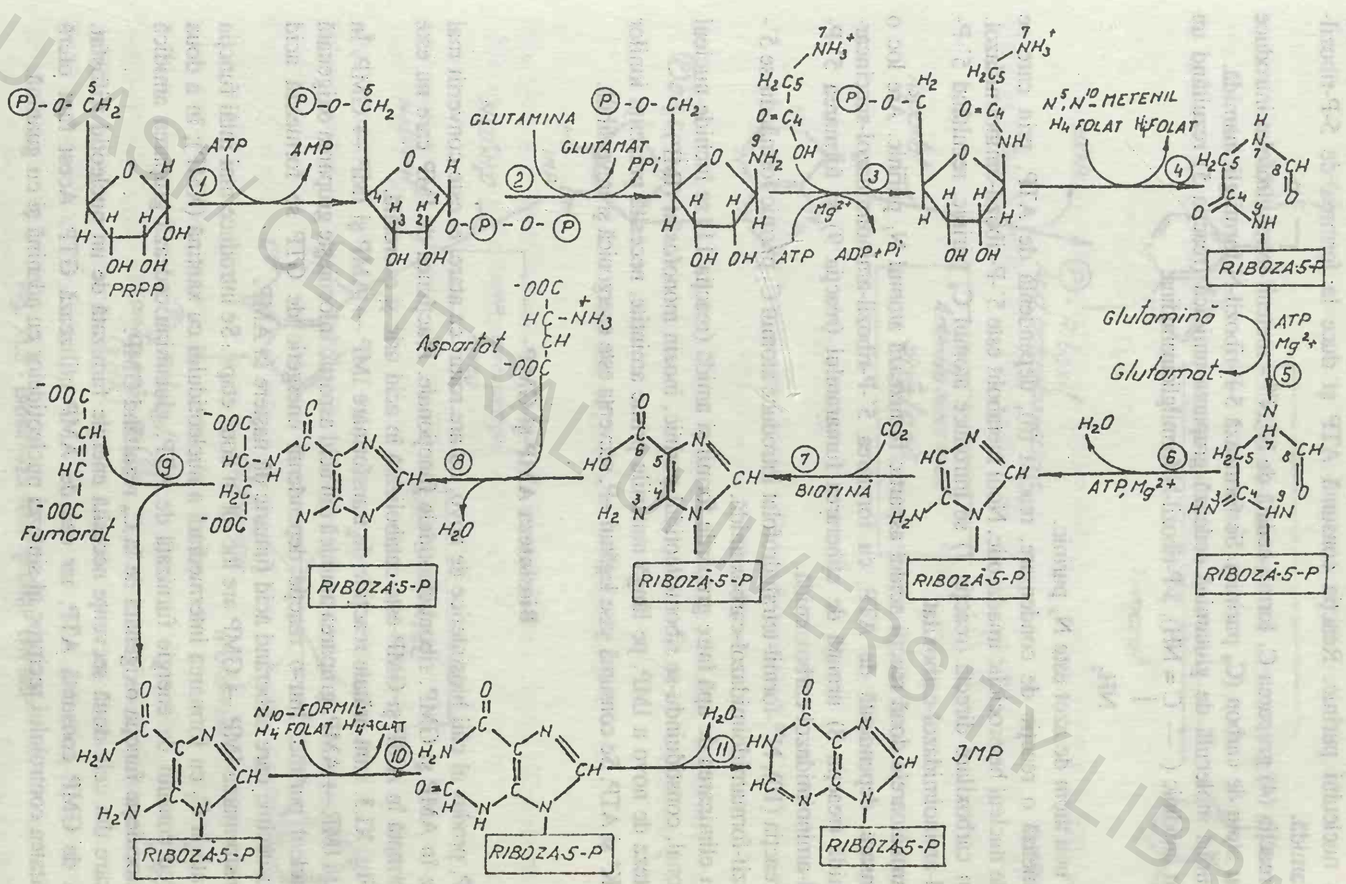


Fig. XI.2 - Biosinteza IMP

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin condensarea 5-P-ribozilaminei cu glicină (reacţia 3) se introduc atomii C_4, C_5 şi N_7 ai nucleului purinic. Reacţia consumă ATP şi duce la formrea de 5-P-ribozil-glicinamidă.

În reacţia (4) gruparea C_1 formil cedată de N^5,N^{10} - metenil-tetrahidrofolat introduce un nou atom de carbon (C_8 purinic). Se formează 5-P-ribozil-N-formilglicinamidă.

O nouă moleculă de glutamină cedează gruparea amidică (reacţia 5) rezultând un derivat amidinic (— C = NH), 5-P-ribozil-N-formilglicinamidina.

|

NH_2

Acest nou atom de azot este N_3 purinic.

Urmează o reacţie de condensare, reacţia (6), dependentă de ATP, prin care se închide nucleul heterociclic imadazolic. Noul metabolit este 5'-P-ribozil-aminoimidazol.

Prin carboxilare directă (reacţia 7) se introduce atomul C_6 purinic, rezultând 5'-P-ribozil-aminoimidazol-carboxilat.

În următoarele două reacţii acidul aspartic furnizează atomul N_1 purinic. Are loc o condensare, dependentă de ATP, cu formarea 5'-P-ribozil-aminoimidazol-succincarboxamidă (reacţia 8) urmată de eliberarea fumaratului (reacţia 9) şi formarea 5'-P-ribozil-aminoimidazol-carboxamidă.

În reacţia (10), N^{10}-formil-tetrahidrofolat introduce atomul C_2 purinic formându-se 5'-P-ribozil-formamidoimidazol-carboxamidă.

Prin eliminarea de apă între grupările formil şi amidă (reacţia 11) se închide nucleul hexagonal, constiduindu-se ribonucleotidul purinic, inozin monofosfat (IMP).

Sinteza de novo a IMP, pe lângă materiile prime amintite, necesită prezenţa ionilor Mg^{2+}, K^+ şi ATP. Se consumă şase legături ~P, secvenţa este exergonică şi ireversibilă.

Biosinteza AMP şi GMP

IMP, produs al căii biosintetice de novo, nu are roluri ca atare, el este convertit mai departe în AMP şi GMP, ribonucleotidele funcţionale. Fracţiunea de IMP care nu este transformată în AMP şi GMP este catabolizată în acid uric şi excretată.

În Fig. XI.3. sunt arătate reacţiile de transformare IMP → AMP şi IMP → GMP. În secvenţa IMP → AMP, gruparea aminică din acid aspartic înlocuieşte gruparea oxigenată din nucleul purinic. Într-o reacţie dependentă energetic de GTP se formează acid adenilosuccinic care eliberând acid fumaric dă naştere la AMP.

Transformarea IMP → GMP are loc tot în două etape. Se introduce mai întâi funcţia oxigenată la C_2 cu formarea intermediară a nucleotidului cu xantină (XMP); în a doua etapă, cu consum de energie furnizată de ATP, glutamina cedează gruparea amidică care înlocuieşte funcţia oxigenată de la C_6 rezultând GMP.

Fiecare din cele două secvenţe necesită energie furnizată de un nucleotid trifosfat, sinteza de GMP consumă ATP, iar cea de AMP utilizează GTP. Acest fapt oferă posibilitatea controlului reciproc al sintezei nucleotidelor cu adenină şi cu guanină.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

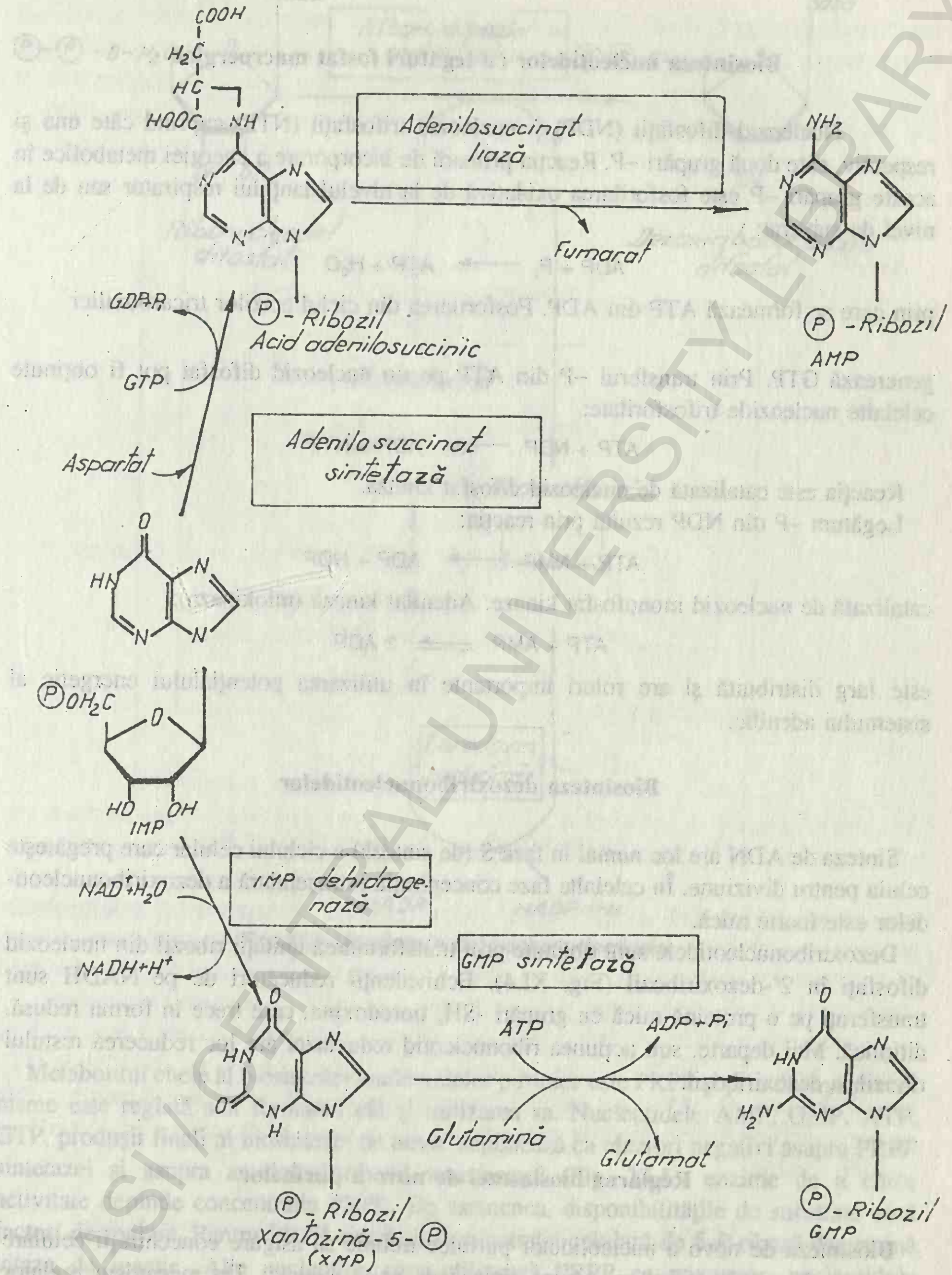


Fig. XI.3 - Biosinteza AMP şi GMP din IMP

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biosinteza nucleotidelor cu legături fosfat macroergice

Nucleozid difosfaţii (NDP) şi nucleozid trifosfaţii (NTP) cuprind câte una şi respectiv, câte două grupări ~P. Reacţia primară de încorporare a energiei metabolice în aceste grupări ~P este fosforilarea oxidativă de la nivelul lanţului respirator sau de la nivel de substrat:

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$$

prin care se formează ATP din ADP. Fosforilarea din ciclul acizilor tricarboxilici generează GTP. Prin transferul ~P din ATP pe un nucleozid difosfat pot fi obţinute celelalte nucleozide trifosforilate:

$$ATP + NDP \longrightarrow ADP + NTP$$

Reacţia este catalizată de nucleozid difosfat kinaza.

Legătura ~P din NDP rezultă prin reacţia:

$$ATP + NMP \longrightarrow ADP + NDP$$

catalizată de nucleozid monofosfat kinaze. Adenilat kinaza (miokinaza):

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP$$

este larg distribuită şi are roluri importante în utilizarea potenţialului energetic al sistemului adenilic.

Biosinteza dezoxiribonucleotidelor

Sinteza de ADN are loc numai în faza S (de sinteză) a ciclului celular care pregăteşte celula pentru diviziune. În celelalte faze concentraţia intracelulară a dezoxiribonucleotidelor este foarte mică.

Dezoxiribonucleotidele sunt obţinute prin transformarea unităţii ribozil din nucleozid difosfaţi în 2'-dezoxiribozil (Fig. XI.4). Echivalenţii reducători de pe NADH sunt transferaţi pe o proteină mică cu grupări -SH, tioredoxina, care trece în forma redusă, ditiolică. Mai departe, sub acţiunea ribonucleotid reductazei are loc reducerea restului ribozil la dezoxiribozil.

Reglarea biosintezei de novo a purinelor

Biosinteza de novo a nucleotidelor purinice trebuie să asigure concentraţii celulare adecvate ale acestor compuşi pentru sinteza de acizi nucleici. Un mecanism reglator asigură cantitatea de IMP şi un altul repartizarea acestui nucleotid între AMP şi GMP. Transformarea nucleozid monofosfaţilor în trifosfaţi, ATP şi GTP, este controlată de încărcarea energetică celulară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

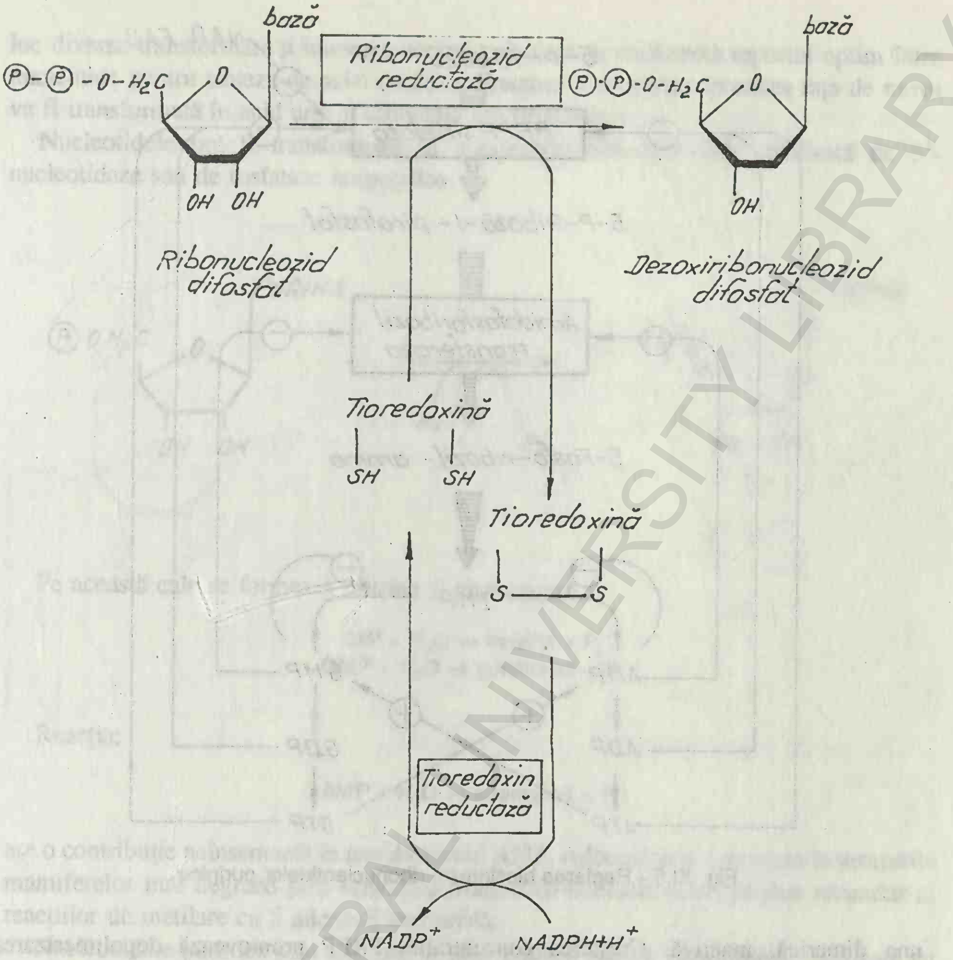


Fig. XI.4 - Biosinteza dezoxiribonucleotidelor

Metabolitul cheie al biosintezei nucleotidelor purinice este PRPP şi prin diverse mecanisme este reglată atât formarea cât şi utilizarea sa. Nucleotidele AMP, GMP, ATP, GTP, produşii finali ai biosintezei de novo, acţionează ca efectori negativi asupra PRPP sintetazei şi asupra amidofosforibozil transferazei (Fig. XI.5), enzime de a căror activitate depinde concentraţia PRPP. De asemenea, disponibilităţile de substrate sunt factori de reglare. Pentru PRPP sintetaza concentraţia celulară de 5-P-riboză determină viteza de reacţie. Alte nucleotide care utilizează PRPP ca precursor, nucleotidele pirimidinice, NAD, FAD, CoA, inhibă PRPP sintetaza, gradul de inhibiţie depinzând de concentraţia totală a acestor compuşi.

Amidofosforibozil transferaza este reglată atât de concentraţia substratului, PRPP, cât şi de produşii finali. Enzima poate exista într-o formă monomerică activă catalitic, şi

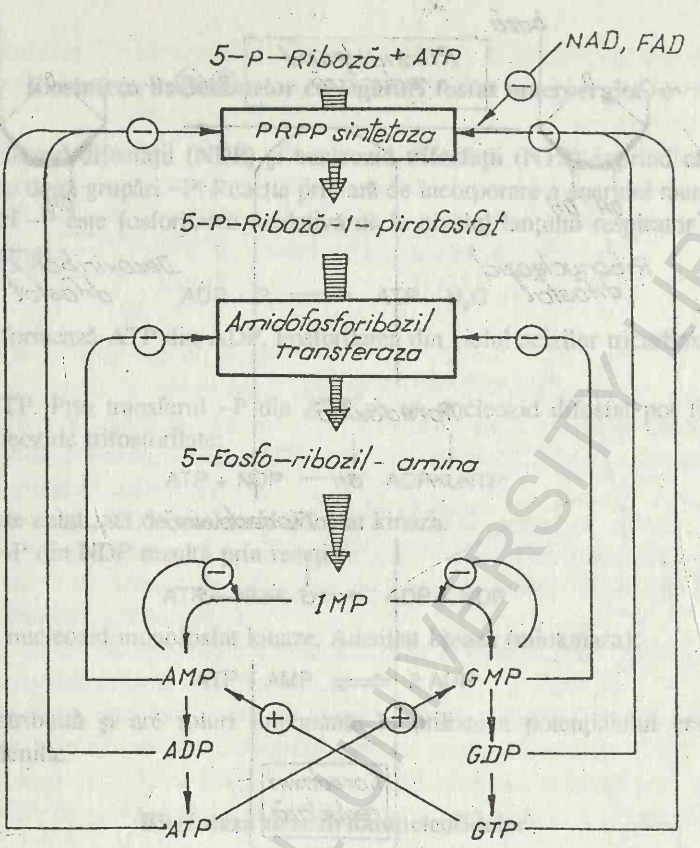


Fig. XI.5 - Reglarea biosintezei ribonucleotidelor purinice

una dimerică, inactivă. Creşterea concentraţiei PRPP promovează depolimerizarea asociată cu activitarea enzimei; nucleotidele purinice acţionează în sens opus, dimerizarea enzimei şi scăderea eficienţei catalitice. Glutamina, co-substratul amidofosforibozil transferazei, accelerează reacţia şi creşte fluxul de metaboliţi pe calea biosintetică.

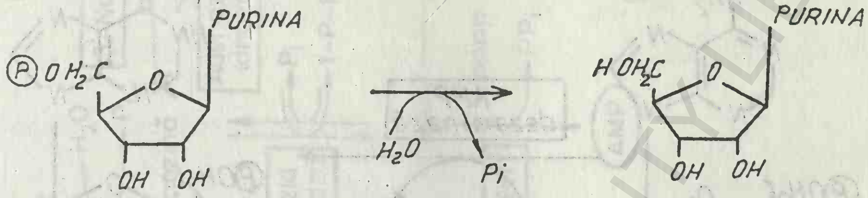
Transformările IMP → AMP şi IMP → GMP sunt reglate prin inhibiţie feed-back de produşii finali (Fig. XI.5). În plus, nevoia de ATP pentru sinteza de GMP şi de GTP pentru obţinerea de AMP, face posibilă funcţionarea unui control pozitiv şi reciproc. Prin aceste mecanisme concentraţiile nucleotidelor cu adenină şi guanină sunt corelate cu nevoile celulare.

XI.1.2. INTERCONVERSIUNILE ŞI REUTILIZAREA PURINELOR

Acizii ribonucleici sunt continuu degradaţi, ARN_m cu viteză mai mare, ARN_r mai încet. Legăturile 3'-5'-fosfodiesterice sunt scindate de ribonucleaze. Nucleotidele eliberate din ARN, împreună cu acelea obţinute prin sinteză de novo sau din purine exogene, alcătuiesc un fond metabolic comun accesibil tuturor celulelor. În cadrul acestui fond au

loc diverse transformări şi interconversiuni prin care se realizează raportul optim între nucleotide pentru sinteza de acizi nucleici. Fracţiunea de purine în exces faţa de nevoi va fi transformată în acid uric şi eliminată din organism.

Nucleotidele pot fi transformate în nucleozide prin hidroliză, catalizată de 5'-nucleotidaze sau de fosfataze nespecifice.



Pe această cale se formează inozina şi guanozina:

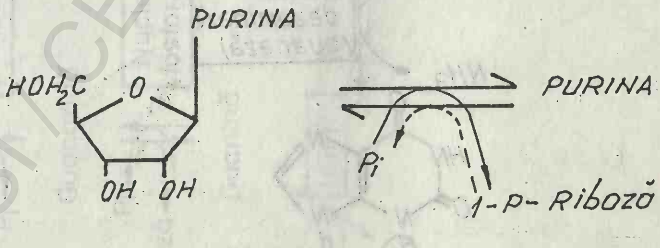
$$IMP + H_2O \rightarrow \text{inozină} + P_i$$
$$GMP + H_2O \rightarrow \text{guanozină} + P_i$$

Reacţia:

$$AMP + H_2O \rightarrow \text{adenozină} + P_i$$

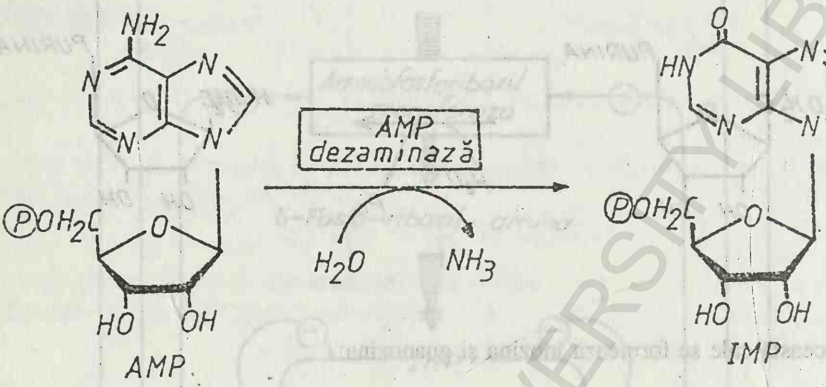
are o contribuţie neînsemnată în metabolismul AMP. Adenozina se formează în ţesuturile mamiferelor mai degrabă prin scindarea S-adenozil-homocisteinei, produs secundar al reacţiilor de metilare cu S-adenozil-metionină.

Nucleozidele purinice sunt scindate la baze printr-o reacţie fosforilitică, catalizată de nucleozid fosforilaze:

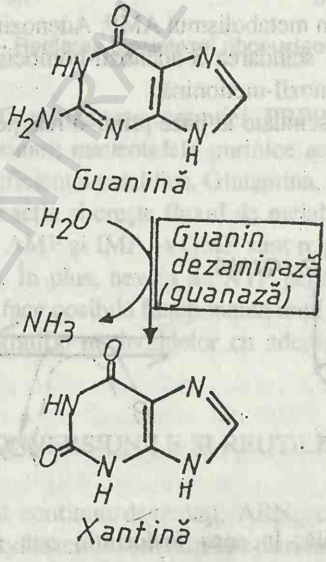


Reacţia este uşor reversibilă. În sens fosforilitic este utilizată pentru eliberarea guaninei din guanozină şi a hipoxantinei din inozină. Adenina nu este, practic, eliberată din adenozină pe această cale.

O altă transformare pe care o pot suferi purinele libere sau derivaţii lor este dezaminarea, prin care o funcţie $-NH_2$ este înlocuită cu una oxigenată. Reacţia poate avea loc la nivel de nucleotid, nucleozid sau bază purinică (Fig. XI.6). Dezaminarea AMP la IMP, sub acţiunea AMP dezaminazei, este calea cea mai probabilă de metabolizare a AMP:



Guanin dezaminaza (guanaza) transformă guanina în xantină:



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

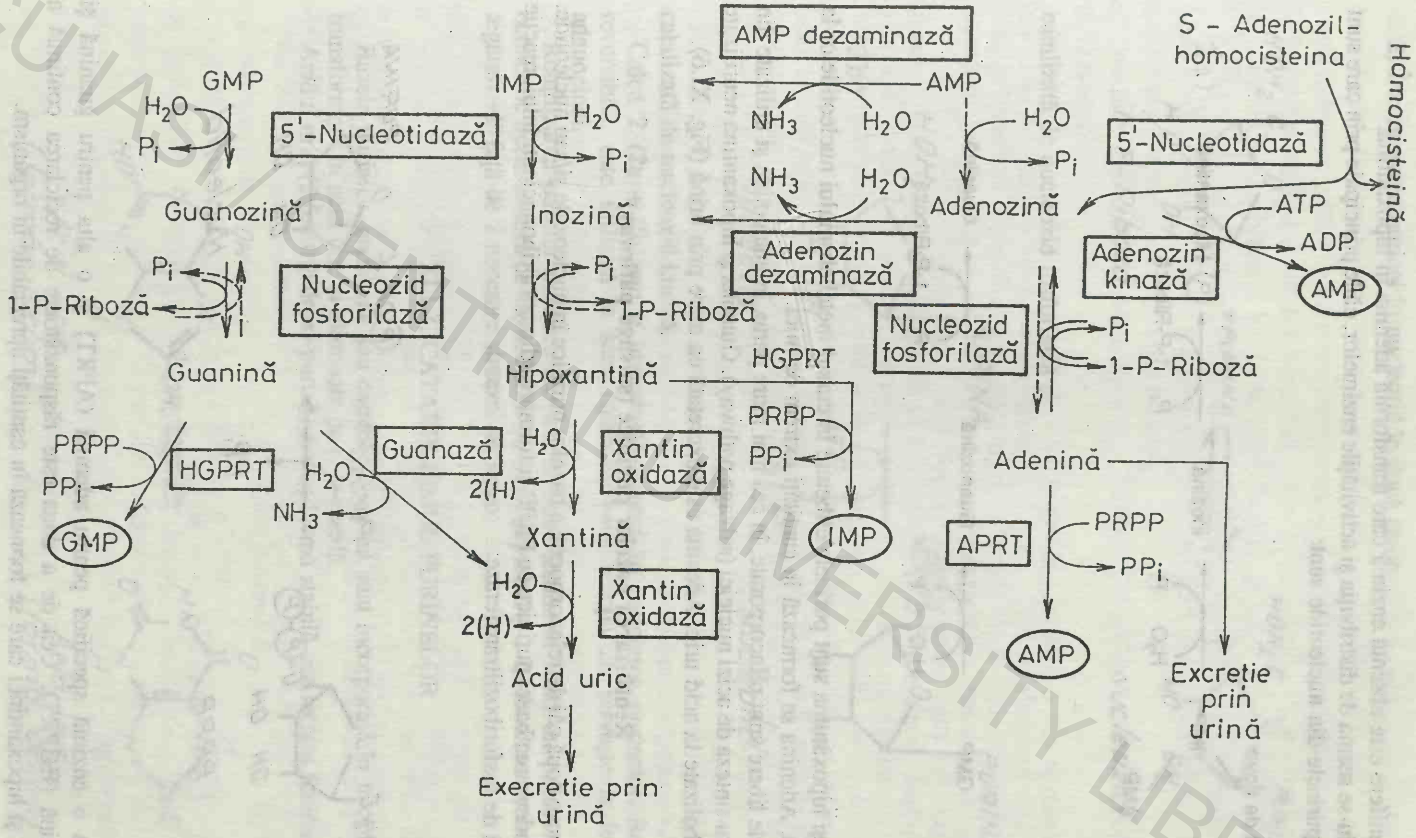
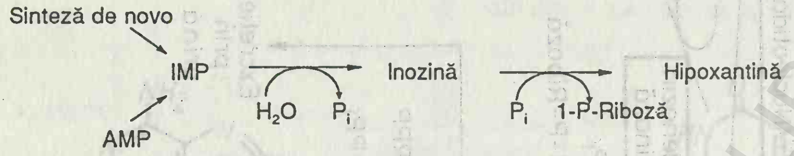


Fig. XI.6 - Căi de interconversiune, reutilizare şi catabolizare a nucleotidelor purinice.

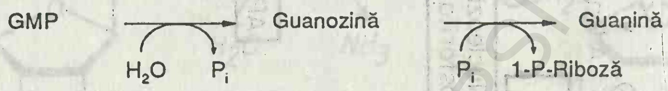
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La mamifere este absentă enzima care transformă adenina în hipoxantină.

Ţinându-se seama de distribuţia şi activităţile enzimelor, căile principale prin care sunt eliberate purinele din nucleotide sunt:



şi



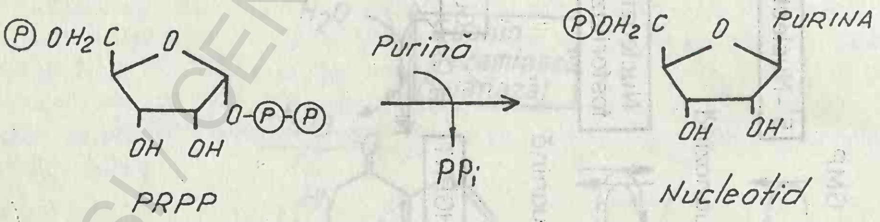
Guanina şi hipoxantina sunt purinele eliberate în cursul metabolismului nucleotidelor la mamifere. Adenina se formează în cantităţi extrem de mici.

Purinele libere sunt reîncorporate, în cea mai mare parte, în nucleotide şi utilizate din nou pentru sinteza de acizi nucleici (salvage pathway). Guanina şi hipoxantina neutilizate sunt catabolizate la acid uric. Adenina este excretată ca atare prin urină (Fig. XI.6).

Reutilizarea bazelor purinice (salvage pathway)

Se cunosc două căi de reîncorporare a bazelor purinice în nucleozide şi/sau nucleotide.

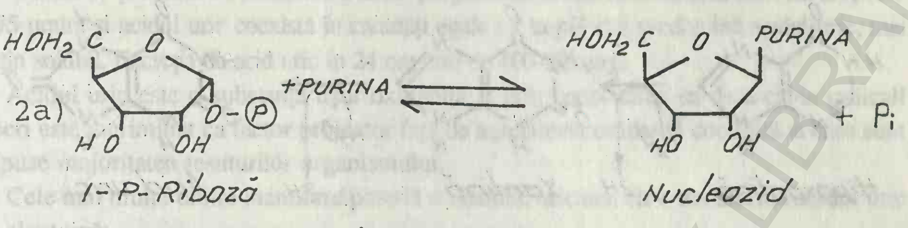
1) Condensarea bazei purinice cu PRPP şi formarea directă a ribonucleotidului, reacţie catalizată de fosforiboziltransferaze:



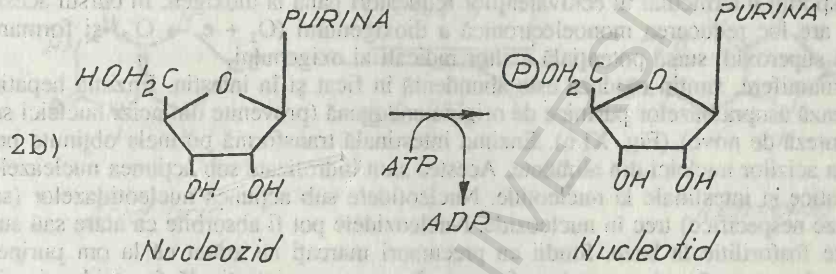
Există o enzimă specifică pentru adenină (APRT) şi o alta pentru guanină şi hipoxantină (HGPRT). Cea de a doua este răspunzătoare de reciclarea continuă a guaninei şi hipoxantinei care se formează în cantităţi apreciabile în organism.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2) Încorporarea purinei în nucleotid în două etape:



catalizată de nucleozid fosforilază şi



catalizată de nucleozid kinază.

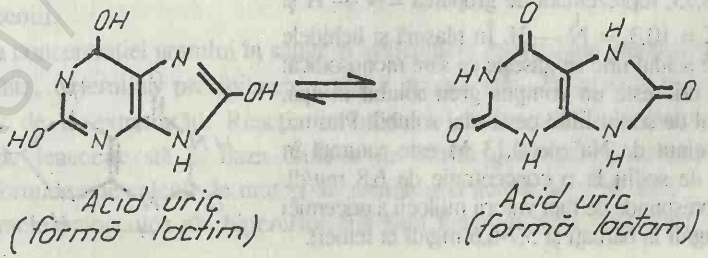
Calea 2 (2a + 2b) are o importanţă minoră în reciclarea purinelor. Reacţia 2a, reversibilă, este utilizată în sens catabolic (←); reacţia 2b serveşte la fosforilarea adenozinei.

Reutilizarea bazelor purinice are loc în toate ţesuturile fiind un proces mult mai economic decât sinteza de novo. Pornindu-se de la purină şi 1-P-riboză se cheltuiesc două legături ~P faţă de 7 necesare sintezei de novo.

XI.1.3. CATABOLISMUL PURINELOR

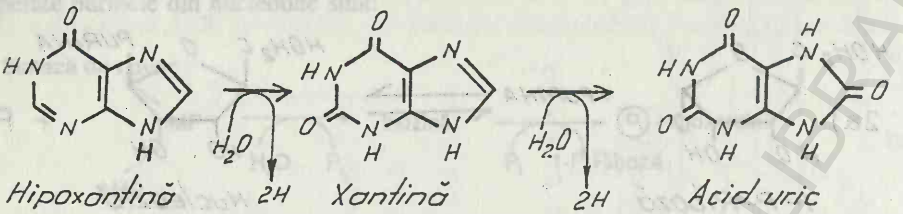
Bazele purinice, endogene sau exogene, care nu sunt incorporate în nucleotide sunt transformate în acid uric şi eliminate pe cale renală.

Acidul uric (2,6,8-trihidroxi-purină) are ca formă stabilă cea lactam (cetonică):



BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se formează din hipoxantină şi din xantină prin oxidare sub acţiunea xantin oxidazei:



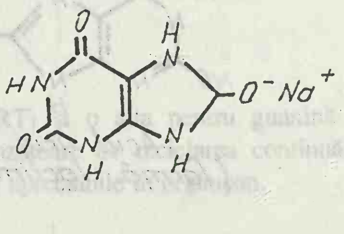
Xantinoxidaza are o structură dimerică şi o masă de aproximativ 275 kdaltoni. Cuprinde două molecule de FAD, 2 atomi de molibden şi 8 atomi de fier care participă la transportul intermediar al echivalenţilor reducători până la dioxigen. În cursul acestei reacţii are loc reducerea monoelectronică a dioxigenului (O_2 + e → O^-_2) şi formarea ionului superoxid, sursă potenţială a altor radicali ai oxigenului.

La mamifere, xantin-oxidaza este abundentă în ficat şi în intestin. Enzima hepatică acţionează asupra bazelor purinice de origine endogenă (provenite din acizi nucleici sau prin sinteză de novo) (Fig. XI.6). Enzima intestinală transformă purinele obţinute prin digestia acizilor nucleici din alimente. Acestea sunt hidrolizate sub acţiunea nucleazelor pancreatice şi intestinale la nucleotide. Nucleotidele sub acţiunea nucleotidazelor (sau fosfataze nespecifice) trec în nucleozide. Nucleozidele pot fi absorbite ca atare sau sunt scindate fosforilitic la baze. Studii cu precursori marcaţi au arătat că la om purinele formate pe această cale sunt transformate în mucoasa intestinală în acid uric, iar pirimidinele sunt oxidate la cataboliţi finali. Rezultă că bazele din acizii nucleici exogeni nu sunt încorporate în compuşi tisulari. Acidul uric astfel format este în parte absorbit şi în parte eliminat, după ce suferă unele transformări în prezenţa florei bacteriene.

La mamifere, acidul uric este un catabolit final, reprezintă forma de eliminare a azotului purinic. La alte specii, păsări, reptile, acidul uric joacă rolul şi de catabolit al azotului proteic. Astfel de specii sunt denumite uricotelice, faţă de ureotelice care elimină azotul proteic ca uree. Uricotelismul reprezintă o adaptare a vieţuitoarelor la un mediu sărac în apă, acidul uric puţin solubil este excretat în stare semisolidă. Eliminarea de uree uşor solubilă, antrenează pierderi mari de lichide din organism.

Ţinându-se seama de cele arătate mai înainte, acidul uric se formează din:
– nucleotidele exogene şi sinteza sa are loc în intestin;
– nucleotidele AMP şi GMP rezultate prin degradarea acizilor ribonucleici celulari;
– nucleotide provenite prin sinteză de novo (IMP, GMP, AMP) şi neutilizate la formarea de acizi nucleici, ca urmare a unui dezechilibru între sinteză şi nevoi.

Acidul uric are două funcţii acide, una mai tare cu pK = 5,75, reprezentată de gruparea $= \overset{9}{N} — H$ şi alta cu pK = 10,3, $= \overset{1}{N} — H$. În plasmă şi lichidele interstiţiale acidul uric se găseşte ca sare monosodică:



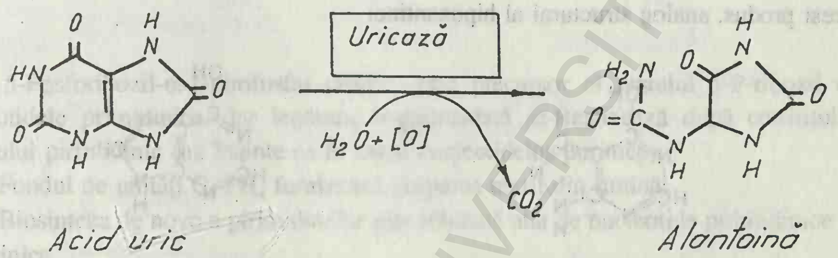
Acidul uric este un compus greu solubil în apă, monouratul de sodiu fiind ceva mai solubil. Plasma, cu un conţinut de Na^+ de 0,13 M este saturată în monourat de sodiu la o concentraţie de 6,8 mg/dl. Aceasta corespunde de fapt valorii mijlocii a uricemiei (6,9-7,5 mg/dl la bărbaţi şi 5,7-6,6 mg/dl la femei).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eliminarea renală a monouratului de sodiu este un proces complex, desfăşurat în patru timpi, filtrare glomerulară, reabsorbţie tubulară, secreţie şi reabsorbţie tubulară postsecretorie. Pe măsură ce procesul de acidifiere a urinii progresează uratul trece în acid uric. La un pH = 5,75 uratul şi acidul uric coexistă în cantităţi egale iar la pH < 5 predomină acidul uric, mai puţin solubil. Excreţia de acid uric în 24 ore este de 400-600 mg.

Acidul uric este o substanţă uşor oxidabilă şi prin capacitatea sa de a capta radicali liberi este incriminat ca factor protector faţă de agresiunea oxidantă continuă la care sunt expuse majoritatea ţesuturilor organismului.

Cele mai multe dintre mamifere posedă o enzimă, uricaza, care transformă acidul uric în alantoină:



Enzima este absentă tocmai la acele specii (om, maimuţă) care nu pot sintetiza acid ascorbic. Se consideră că funcţia antioxidantă a acidului uric ar compensa incapacitatea unor organisme de a sintetiza acidul ascorbic, compus major al potenţialului antioxigenic.

XI.1.4. PATOLOGIA METABOLISMULUI PURINELOR

Guta este o maladie a cărei tulburare biochimică majoră este hiperuricemia. Clinic se manifestă prin dureri artritice episodice sau cronice, nefrolitiază şi depozite de acid uric în ţesuturi moi (tofi gutoşi). Guta primară este determinată de o eroare metabolică ereditară prin care se sintetizează acid uric în exces (majoritatea cazurilor) sau este încetinit clearance-ul acidului uric (gută renală). Hiperuricemia mai poate să apară ca o consecinţă a altor tulburări (gută secundară).

Turnoverul rapid al acizilor nucleici (leucemii, anemie hemolitică, iradiere) este asociat cu hiperuricemii.

Creşterea concentraţiei uratului în sânge şi în lichidele interstiţiale, depăşirea pragului de solubilitate, determină precipitarea uratului monosodic, în primul rând în jurul articulaţiilor de la extremităţi. Reacţia inflamatorie declanşată de cristalele de urat fagocitate de leucocite stă la baza crizelor de artrită gutoasă. La nivel renal este favorizată formarea de calculi de urat şi, în urinile mai acide, de acid uric.

Mecanismele patogenice ale hiperuricemiei sunt heterogene şi complexe. Creşterea

BCU Cluj / Central University Library

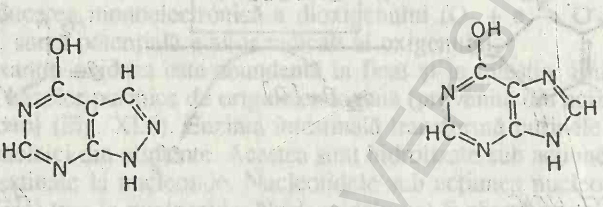
concentraţiei PRPP, metabolit cheie în sinteza de novo şi la reutilizarea bazelor purinice, este factorul etiopatogenic principal al hiperuricemiei. Creşterea fondului de PRPP este rezultatul unei sinteze crescute sau încetinirii ritmului de utilizare. Au fost descrise mai multe deficite enzimatice care măresc fondul de PRPP şi, respectiv, determină hiperuricemie:

a) Variante de PRPP sintetază cu activitate catalitică crescută sau cu sensibilitate redusă la inhibiţia prin produşi finali.

b) Deficienţe de HGPRT, enzima cheie a reutilizării guaninei şi hipoxantinei.

c) Deficienţa de glucozo-6-fosfatază; absenţa acestei enzime împiedică eliberarea glucozei din glucozo-6-P şi acesta din urmă este pompat pe calea pentozo-fosfaţilor cu producere în exces de ribozo-5-P, materia primă din care se obţine PRPP.

Hiperuricemiile, primare sau secundare, sunt corectate prin administrarea de alopurinol. Acest produs, analog structural al hipoxantinei



Alopurinol   Hipoxantină

inhibă xantinoxidaza şi împiedică transformarea hipoxantinei în xantină şi a acesteia din urmă în acid uric. În aceste condiţii, hipoxantina şi xantina sunt excretate drept cataboliţi finali ai purinelor. Hipoxantina şi xantina sunt mult mai solubile decât acidul uric, nu se depun în ţesuturi, evitându-se efectele nocive ale hiperuricemiilor. În plus, hipoxantina şi xantina în exces favorizează conversia lor în ribonucleotide (sub acţiunea fosforiboziltransferazei), cu scăderea concentraţiei PRPP şi micşorarea fluxului de metaboliţi spre sinteză de novo.

Sindromul Lesch-Nyhan este caracterizat prin hiperuricemie severă şi prin manifestări neurologice bizare, agresivitate, tendinţă de automutilare, deficienţă mintală. Deficitul biochimic, bine caracterizat, constă în deficienţa totală a hipoxantin-guanin-fosforibozil transferazei, cu pierderea capacităţii de reutilizare a bazelor purinice. Ca urmare, creşte concentraţia PRPP şi ritmul sintezei de novo. Gena defectă este situată pe cromozomul X şi deficitul enzimatic complet se manifestă numai la bărbaţi. Bazele biochimice ale manifestărilor neurologice nu sunt cunoscute.

XI.2. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Nucleotidele pirimidinice au roluri similare cu acelea purinice şi metabolismul acestor compuşi prezintă multe elemente comune, alături de trăsături specifice.

a) Bazele pirimidinice sunt sintetizate din precursori simpli, aminoacizi şi CO_2 (Fig. XI.7).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

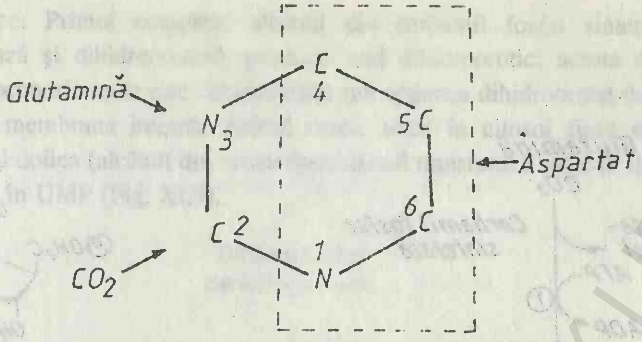


Fig. XI.7 - Precursorii nucleului pirimidinic

b) 5-Fosforibozil-α-1-pirofosfat (PRPP) este precursor al restului 5-P-ribozil din nucleotidele primidinice, dar legătura N-glicozidică se realizează după constituirea nucleului pirimidinic (nu înainte ca în cazul nucleotidelor purinice).

c) Fondul de unităţi C_1-FH_4 furnizează gruparea metil din timină.

d) Biosinteza de novo a pirimidinelor este inhibată atât de nucleotide pirimidinice cât şi purinice.

e) Produşii de degradare a acizilor nucleici tisulari pot fi reciclaţi. La pirimidine funcţionează mecanisme eficiente de reutilizare a nucleozidelor şi nu a bazelor.

f) Dezoxiribonucleotidele pirimidinice sunt obţinute în mod similar cu acelea purinice.

XI.2.1. BIOSINTEZA DE NOVO A NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Sinteza nucleotidelor pirimidinice utilizează ca materii prime aminoacizi, CO_2, unităţi active C_1, PRPP (Fig. XI.8). Primul metabolit al căii, carbamil fosfatul, este comun şi pentru ureogeneză. Există însă două fonduri de carbamil fosfat, unul mitocondrial, ureogenetic, şi altul citosolic, pirimidinogenetic. Enzimele care generează carbamil fosfat sunt distincte, utilizează surse diferite de azot, NH_3 cea ureogenetică şi glutamină cea pirimidinogenetică, reacţia (1):

$$CO_2 + \text{glutamină} + ATP \longrightarrow H_2N - CO{\sim}P + ADP + \text{glutamat}$$

Prima reacţie specifică biosintezei de pirimidine (reacţia 2) este catalizată de aspartat transcarbamilază şi conduce la formarea acidului carbamilaspartic. Prin condensarea acestuia din urmă (reacţia 3) se închide nucleul heterociclic şi după dehidrogenare (reacţia 4) se obţine un compus pirimidinic, acidul orotic (2,4-dihidroxi-6-carboxi-pirimidină). În reacţia 5 are loc transferul restului 5-P-ribozil din PRPP pe acidul orotic rezultând un nucleotid-acid orotidilic (orotidinmonofosfat, OMP). Enzima care intervine

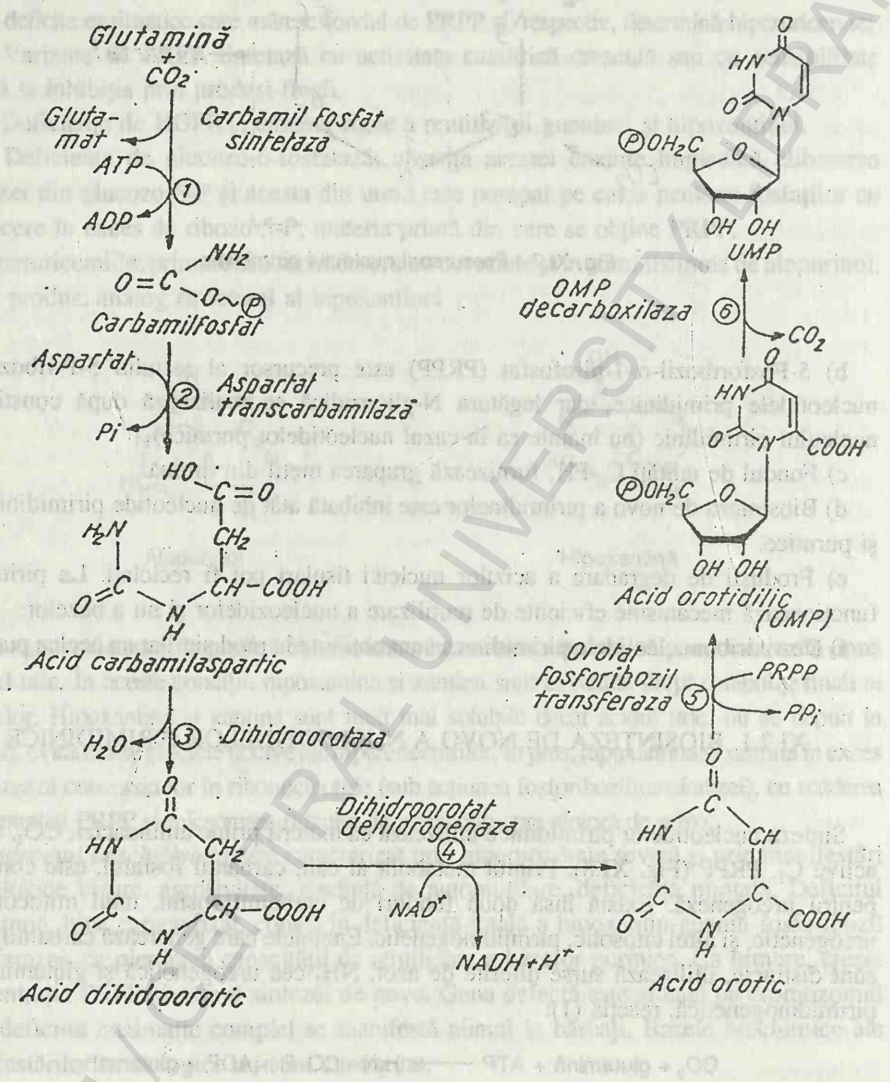


Fig.XI.8 - Biosinteza de novo a UMP

în această etapă, orotat fosforibozil transferaza este similară cu HGPRT şi APRT. Primul nucleotid pirimidinic funcţional, UMP, se formează prin decarboxilarea OMP (reacţia 6).

Enzimele căii de sinteză a UMP au o localizare dublă, citosolică (enzimele 1-3 şi 5-6) şi mitocondrială (enzima 4). Enzimele citosolice sunt organizate în două complexe

multienzimatice. Primul complex, alcătuit din carbamil fosfat sintetază, aspartat transcarbamilază şi dihidroorotază, produce acid dihidroorotic; acesta difuzează din citosol în mitocondrie unde este dehidrogenat sub acţiunea dihidroorotat dehidrogenazei localizată pe membrana internă. Acidul orotic trece în citosol fiind supus acţiunii complexului al doilea (alcătuit din orotat fosforibozil transferază şi OMP decarboxilază) şi transformat în UMP (Fig. XI.9).

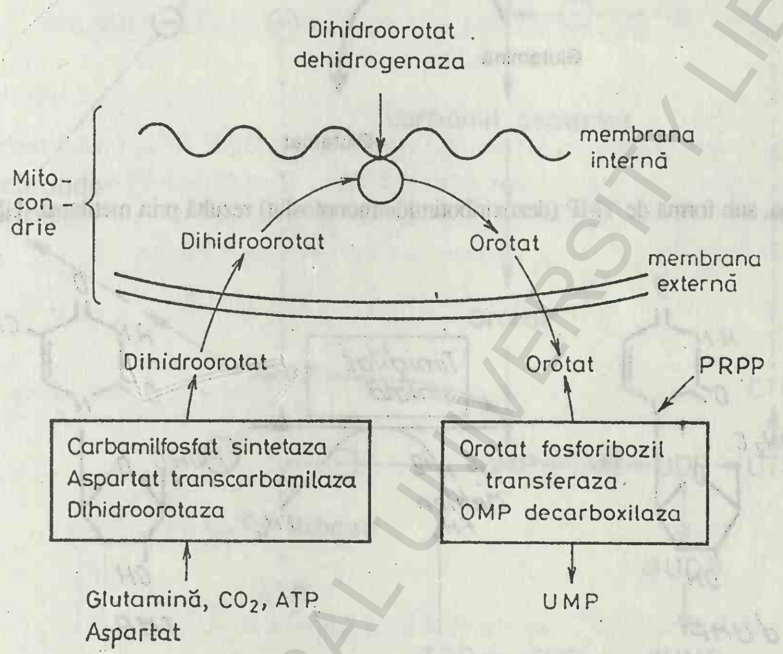
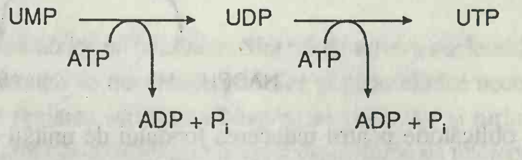


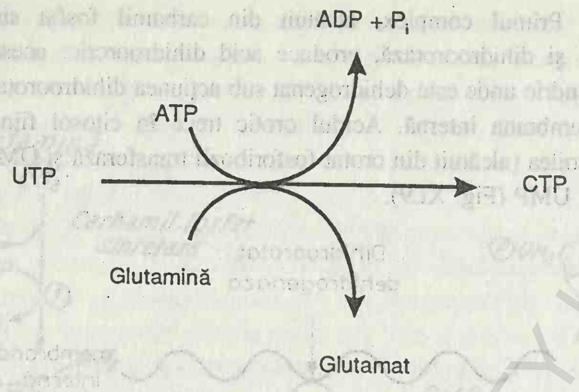
Fig. XI.9 - Localizarea intracelulară a enzimelor participante la biosinteza UMP

De la UMP sunt obţinute celelalte nucleotide pirimidinice. Prin fosforilări catalizate de kinaze rezultă UDP şi UTP:

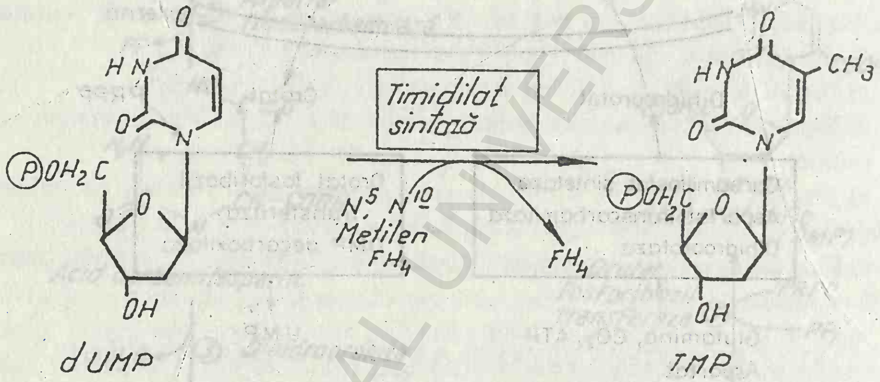


Nucleotidul cu citozină, CTP, este obţinut din UTP prin înlocuirea funcţiei oxigenate de la C_4 cu gruparea aminică furnizată de glutamină (sub acţiunea CTP sintetazei):

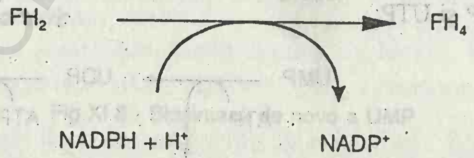
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Timina, sub formă de TMP (dezoxiribotimidinmonofosfat) rezultă prin metilarea UMP:



N^5,N^{10}-Metilen-FH_4 furnizează gruparea C_1 şi doi atomi de hidrogen necesari grupei $-CH_3$ şi se transformă în dihidrofolat (FH_2). Conversia $FH_2 \rightarrow FH_4$:



este obligatorie pentru reducerea fondului de unităţi C_1 active. Ţesuturile în diviziune, unde are loc o sinteză rapidă de TMP, sunt foarte sensibile la inhibiţia dihidrofolat reductazei. Mulţi compuşi cu această acţiune, unii analogi chimici ai acidului folic, sunt utilizaţi în chimioterapia cancerului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

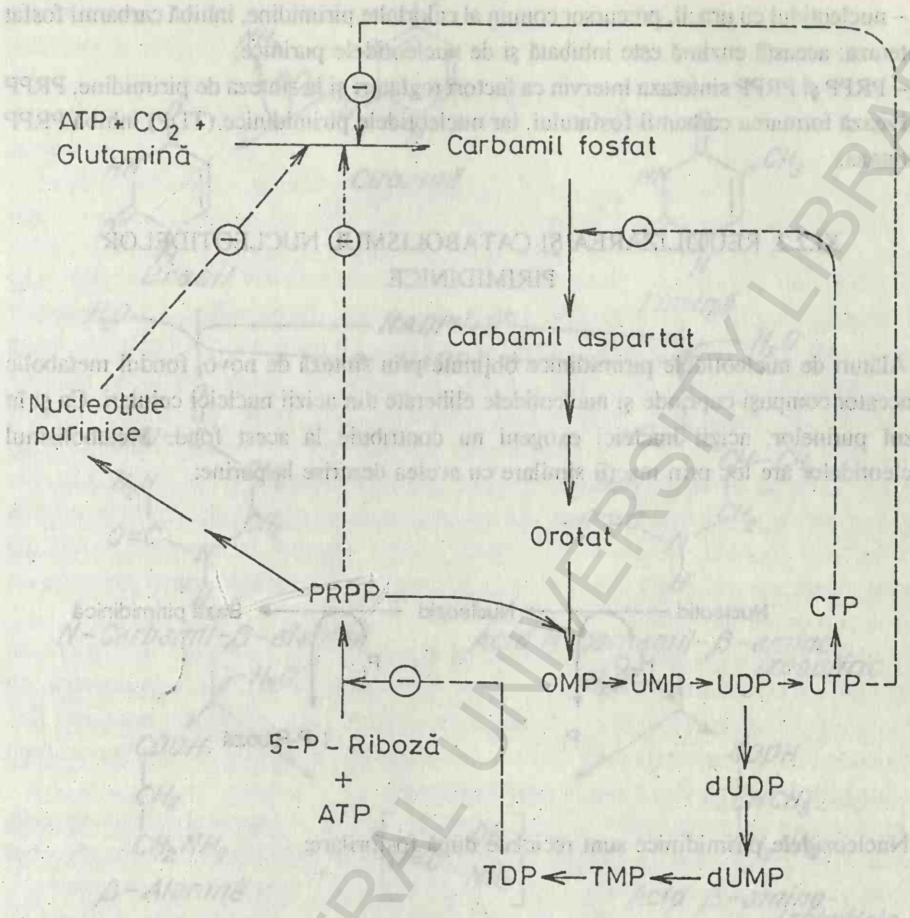


Fig. XI.10 - Reglarea biosintezei nucleotidelor pirimidinice
Săgeţile pline (———→) indică reacţii; săgeţile punctate (----->) indică un control pozitiv (+) sau unul negativ (-)

Reglarea sintezei de novo a nucleotidelor pirimidinice. Sinteza de novo a nucleotidelor trebuie să asigure cantitatea şi varietatea de nucleotide purinice şi pirimidinice necesară sintezei acizilor nucleici. Pe lângă reglarea separată a biosintezei purinelor şi pirimidinelor, funcţionează şi un control încrucişat între sinteza acestor două grupe de nucleotide. Principalele puncte de control (Fig. XI.10) sunt:

– inhibiţia feed-back a aspartat transcarbamilazei de către nucleotidele pirimidinice, cel mai puternic inhibitor fiind CTP;

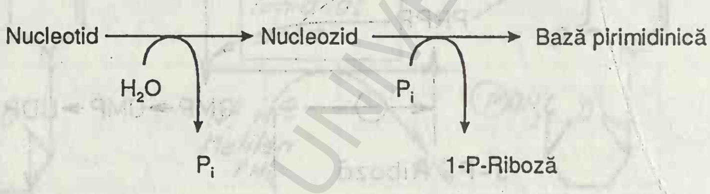
BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– nucleotidul cu uracil, precursor comun al celorlalte pirimidine, inhibă carbamil fosfat sintetaza; această enzimă este inhibată şi de nucleotidele purinice;

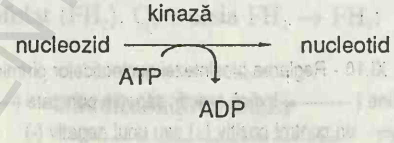
– PRPP şi PRPP sintetaza intervin ca factori reglatori şi la sinteza de pirimidine, PRPP activează formarea carbamil fosfatului, iar nucleotidele pirimidinice (TDP) inhibă PRPP sintetaza.

XI.2.2. REUTILIZAREA ŞI CATABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Alături de nucleotidele pirimidinice obţinute prin sinteză de novo, fondul metabolic al acestor compuşi cuprinde şi nucleotidele eliberate din acizii nucleici celulari. Ca şi în cazul purinelor, acizii nucleici exogeni nu contribuie la acest fond. Metabolismul nucleotidelor are loc prin reacţii similare cu acelea descrise la purine:



Nucleozidele pirimidinice sunt reciclate după fosforilare:



O kinază acceptă ca substrat uridina şi citidina şi o alta timidina. În cazul purinelor această cale metabolică este de mică importanţă, singură adenozina putând fi fosforilată la AMP.

Bazele pirimidinice libere, spre deosebire de cele purinice, nu mai sunt reutilizate ci degradate la compuşi cu moleculă mică (β-alanină şi acid β-aminoizobutiric) alături de CO_2 şi NH_3 (Fig. XI.11). β-Alanina şi acidul β-aminoizobutiric sunt fie excretaţi ca atare, fie catabolizaţi pe căile oxidative terminale.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

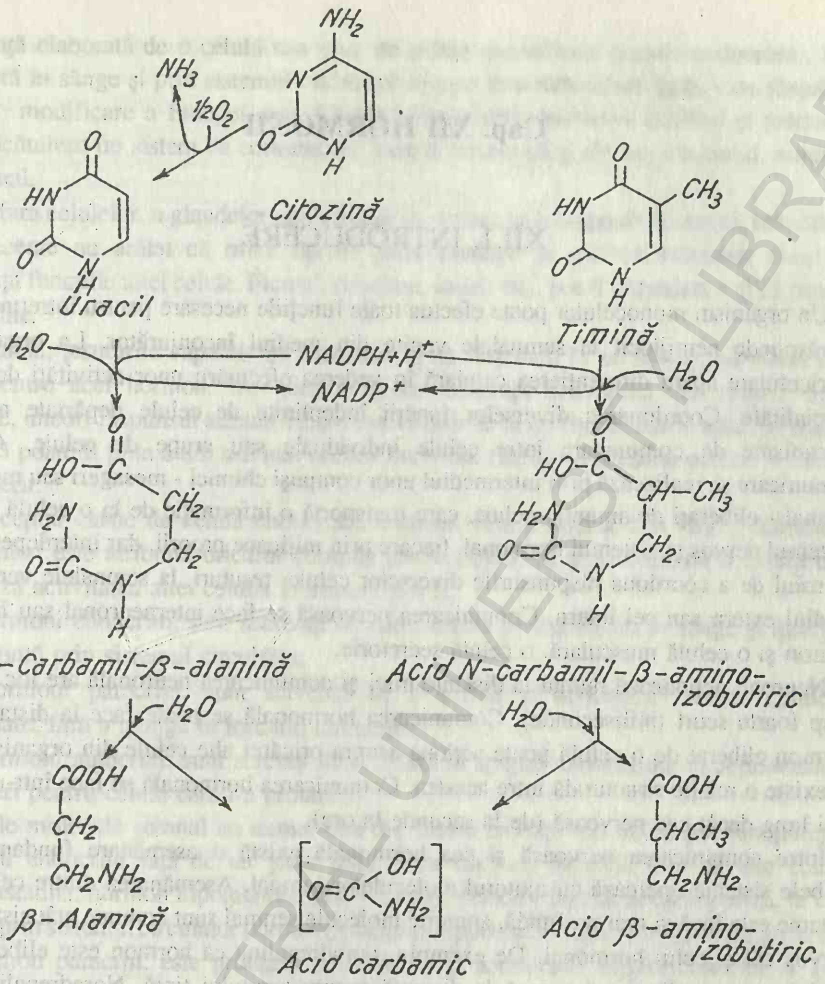


Fig. XI.11 - Catabolismul bazelor purinice

XI.2.3. PATOLOGIA METABOLISMULUI PIRIMIDINELOR

Cercetări recente au pus în evidenţă unele defecte metabolice ale metabolismului pirimidinelor. Cea mai bine caracterizată din punct de vedere biochimic este orotaciduria ereditară, în care se excretă cantităţi mari de acid orotic şi orotidină. Defectul metabolic este situat la nivelul complexului multienzimatic care utilizează acidul orotic ca substrat. Neputând sintetiza pirimidine bolnavii sunt dependenţi de aportul exogen continuu al acestor compuşi.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. XII HORMONII

XII.1. INTRODUCERE

Un organism monocelular poate efectua toate funcţiile necesare pentru întreţinerea sa şi răspunde nemijlocit la semnalele venite din mediul înconjurător. La organimsle pluricelulare apare diferenţierea celulară în vederea efectuării unor activităţi de înaltă specialitate. Coordonarea diverselor funcţii îndeplinite de celule depărtate necesită mecanisme de comunicare între celule individuale sau grupe de celule. Această comunicare se realizează prin intermediul unor compuşi chimici - mesageri sau molecule semnal - eliberaţi de anumite celule, care transportă o informaţie de la o celulă la alta. Sistemul nervos şi sistemul hormonal, fiecare prin mijloace proprii, dar interdependente, au rolul de a coordona răspunsurile diverselor celule, ţesuturi, la semnalele venite din mediul extern sau cel intern. Comunicarea nervoasă se face interneuronal sau între un neuron şi o celulă musculară, o celulă secretorie.

Neuronii acţionează numai la distanţe mici şi comunicarea neuronală are loc într-un timp foarte scurt (milisecunde). Comunicarea hormonală se poate face la distanţă, un hormon eliberat de o celulă poate acţiona asupra oricărei alte celule din organism fără să existe o relaţie structurală între acestea. Comunicarea hormonală se face într-un timp mai lung decât cea nervoasă (de la secunde la ore).

Între comunicarea nervoasă şi cea hormonală există o asemănare fundamentală, ambele sisteme operează cu ajutorul moleculelor semnal. Asemănarea dintre cele două sisteme este încă şi mai profundă, anumite molecule semnal sunt comune atât sistemului nervos cât şi celui hormonal. De exemplu, noradrenalina ca hormon este eliberată de medulosuprarenală şi acţionează la distanţă asupra ţesutului ţintă. Noradrenalina este însă eliberată şi de către neuronii simpatici funcţionând ca neutrotransmiţător. Mecanismele de transducţie a semnalelor extracelulare - nervoase sau hormonale - sunt comune pentru cele două sisteme. Mesajul transmis prin intermediul acetilcolinei, eliberată de neuronii parasimpatici (colinergici), este receptat într-o celulă ţintă (de exemplu o celulă musculară netedă) şi transformat în răspuns intracelular printr-un mecanism transductor identic cu acela care prelucrează şi semnale hormonale. Interrelaţiile dintre sistemul nervos şi cel endocrin merg şi mai departe, secreţiile hormonale sunt influenţate, direct sau indirect, de către creier şi în mod reciproc, hormonii influenţează activitatea sistemului nervos central.

Termenul de hormon a fost introdus de către William Bayliss şi Ernest Starling în 1904 pentru a descrie funcţia secretinei, substanţă eliberată în sânge de către duoden în momentul pătrunderii conţinutului gastric şi care stimulează secreţia exocrină pancreatică necesară digestiei. Potrivit acestei definiţii clasice, hormonul este o

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

substanţă elaborată de o celulă sau grup de celule specializate (celule endocrine), este secretată în sânge şi prin sistemul circulator ajunge la o altă celulă ţintă, care răspunde printr-o modificare a funcţiei sale. Glandele endocrine, hormonii produşi şi ţesuturile ţintă alcătuiesc un sistem de comunicare între diversele părţi ale organismului, sistemul hormonal.

În afara celulelor, a glandelor specializate în sinteza şi secreţia de hormoni, cercetările mai recente au arătat că orice tip de ţesut produce şi secretă substanţe care pot influenţa funcţiile altei celule. Ficatul, rinichiul, inima etc., pot fi considerate şi ca organe endocrine.

Celulele, ţesuturile capabile să recepteze şi să răspundă la un mesaj hormonal sunt ţintă pentru acel hormon. Un hormon poate influenţa activitatea mai multor tipuri celulare, uneori răspunsul acestor celule este diferit de la un tip celular la altul. În sfârsit, o celulă poate fi ţinta a doi sau mai multor hormoni, răspunsul acesteia putând fi identic sau diferit.

Conceptul clasic de celulă endocrină, hormon, celulă ţintă a fost lărgit, denumirea de hormon este atribuită oricărui compus chimic, elaborat şi secretat de o celulă care afectează activitatea altei celule. Hormonii pot fi:

- hormoni endocrini, sunt secretaţi de către celula producătoare în sânge şi ajung la celula ţintă prin sistemul circulator;
- hormoni paracrini, sunt secretaţi de o celulă şi acţionează asupra celulelor învecinate, fără a ajunge în torentul circulator;
- hormoni autocrini, sunt scretaţi de o celulă în spaţiul extracelular şi acţionează ca mesageri pentru celula care i-a produs.

Unele molecule semnal au numai una din aceste calităţi, dar altele pot funcţiona ca hormoni endocrini faţă de un ţesut ţintă şi ca hormon paracrin faţă de alte celule. Somatostatina, hormon hipotalamic, este hormon endocrin faţă de adenohipofiză, la care ajunge prin sistemul circulator portal hipotalamo-hipofizar. În pancreas, somatostatina este un hormon paracrin, este produsă de celule D şi acţionează asupra celulelor A şi B învecinate, care secretă glucagon şi insulină.

Natura chimică a hormonilor este foarte variată (Tabelul XII.1). Un mare număr dintre ei sunt peptide mici, polipeptide sau molecule proteice mari. Hormonul hipotalamic TRH este un tripeptid. Hormonul de creştere uman cuprinde 191 aminoacizi. Un grup de hormoni, cei corticosuprarenalieni şi sexuali au o structură steroidică. Hormonul 1,25-dihidroxi-calciferol, derivat din vitamina D_3, aparţine aceleiaşi familii. Hormonii tiroidieni şi catecolaminele sunt compuşi cu moleculă mică derivaţi din aminoacidul tirozină. Mulţi alţi hormoni sau neurotransmiţători sunt derivaţi ai aminoacizilor. O altă grupă de hormoni - eicosanoizii - sunt derivaţi ipotetici ai hidrocarburii cu 20 C, eicosan. Această grupă cuprinde prostaglandinele, tromboxanii şi leucotrienele.

Transportul hormonilor în sânge. Hormonii clasici, endocrini, circulă între celula secretorie şi ţesutul ţintă prin sânge. Hormonii solubili sunt prezenţi ca atare în plasmă. În această categorie intră marea majoritate a hormonilor de natură peptidică şi catecolaminele.

Tabelul XII.1

Clasificarea hormonilor după natura chimică

Hormonii peptidici	*Hormonii steroidici*	*Hormonii derivaţi de la tirozină*
Insulină Glucagon Parathormon Calcitonină Oxitocină Vasopresină Gonadotropine Corticotropină (ACTH) Toreotropină (TSH) Prolactină (PRL) Factori de creştere (IGF, EGF, PDGF, NGF) Somatotropină Hormonii hipotalamici eliberatori (RH) Secretină Gastrină Colecistokinină	Cortisol (Glucocorticoid) Aldosteronă (mineralocordicoid) Estradiol Estronă Testosteronă 1,25 -(OH)2-D_3	Adrenalină Noradrenalină Tetraiodotironină (tiroxină, T4) Triiodotironină (T3)

Hormonii steroidici şi cei tiroidieni sunt compuşi hidrofobi şi puţin solubili. Aceşti hormoni în plasmă sunt asociaţi cu proteine transportoare specializate, cu specificitate înaltă, denumite proteine (adesea globuline) de legare (hormone-binding globulin). Astfel de proteine sunt TBG (thyroxine-binding globulin), CBG (cortisol-binding globulin), SHBG (sex hormone-binding globulin), DBP (D-binding protein). Deoarece hormonul liber, nelegat este forma biologic activă, afinitatea şi capacitatea de legare a proteinei transportoare determină numărul de molecule de hormon liber.

Serumalbumina poate lega mulţi dintre hormonii liposolubili. Deşi are afinitate mai mică pentru unul sau altul dintre hormoni, concentraţia sa ridicată îi conferă o capacitate mare de legare, ea putând lega cantităţile excedentare de hormoni plasmatici.

XII.2. RECEPTORII HORMONALI

Capacitatea unei celule de a răspunde la un mesaj hormonal este determinată de prezenţa în acea celulă, pe suprafaţa sa sau intracelular, a unui component capabil să recunoască hormonul, să îl fixeze şi să iniţieze evenimente care să constituie răspunsul celular la mesagerul extern. Aceste componente sunt receptorii hormonali. Pentru unii hormoni, cei peptidici, pentru catecolamine, în general pentru hormonii hidrosolubili, receptorii sunt situaţi în membrana plasmică. Pentru hormonii liposolubili, steroidici şi hormonii tiroidieni, receptorii sunt intracelulari (nucleari).

Receptorii sunt proteine, de cele mai multe ori proteine oligomerice sau multidomeniale, care cuprind cel puţin două regiuni active, una de fixare a hormonului şi altă

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

regiune care prelucrează şi transferă (transduce) semnalul extern unui mecanism efector intracelular care îl transformă în răspuns biologic. Receptorii funcţionează ca proteine alosterice, cele două situsuri active comunică între ele prin tranziţii conformaţionale iniţiate de fixarea hormonului în situsul de legare.

Interacţiunea hormon-receptor este asemănătoare interacţiunii unui substrat cu centrul activ enzimatic. Această interacţiune se realizează prin forţe necovalente, este reversibilă, prezintă o specificitate foarte înaltă prin complementaritatea chimică şi geometrică dintre hormon şi centrul de legare. Interacţiunea hormon-receptor poate fi descrisă:

$$H + R \rightleftharpoons H \cdot R$$

Constanta de disociere a complexului HR, k_d:

$$k_d = \frac{[H][R]}{[HR]}$$

măsoară afinitatea receptorului pentru hormon. Aceste constante au valori între 10^{-6} M şi 10^{-10} M, ceea ce denotă o afinitate foarte mare între un hormon şi receptorul său.

Ocuparea receptorilor cu hormon prezintă fenomenul de saturaţie. Dacă se reprezintă fracţiunea de receptori ocupaţi $\left(Y = \frac{[HR]}{[R_{total}]}\right)$, în funcţie de concentraţia hormonului liber, nelegat, se obţine un arc de hiperbolă. Palierul curbei corespunde ocupării cu ligand a tuturor situsurilor de legare de pe receptor. Concentraţia hormonului când 50% din situsuri sunt ocupate, dă valoarea numerică a k_d (Fig. XII.1).

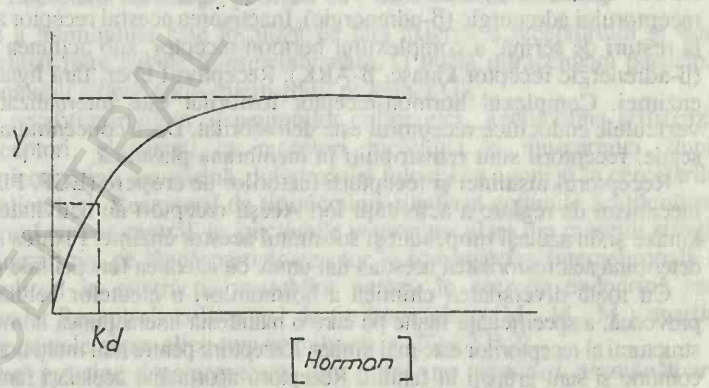


Fig. XII.1 - Curba de saturaţie cu ligand a unui receptor hormonal $Y = [HR]/[R_{total}]$

Afinităţile receptorilor pentru hormoni sunt mari, în acord cu concentraţiile plasmatice reduse ale hormonilor. De asemenea, gradul de ocupare a receptorilor trebuie să corespundă şi fluctuaţiilor mici pe care le suferă concentraţiile hormonilor circulanţi.

Specificitatea unui receptor pentru hormonul specific este foarte mare, totuşi, este posibil ca un receptor să lege şi alţi compuşi, analogi ai hormonului. Un compus (altul decât hormonul specific) care se leagă la un receptor şi legarea sa determină un răspuns celular este denumit *agonist*. Un compus care se poate lega la un receptor, dar legarea sa este neproductivă, nu iniţiază un răspuns, este un *antagonist*. Cunoştinţele privind natura şi mecanismele de funcţionare a receptorilor au fost obţinute, multe dintre ele, prin examinarea răspunsurilor celulare la diverşi agonişti sau antagonişti, naturali şi de sinteză.

Intensitatea răspunsului celular la un mesager depinde de numărul de receptori, de gradul de ocupare al acestora cu ligand. În unele cazuri, s-a constatat că răspunsul biologic este maxim înainte ca toţi receptorii să fie ocupaţi cu ligand. Celula dispune deci de receptori de rezervă (spare receptors), peste nivelul necesar obţinerii unui răspuns biologic maxim. Se consideră că în aceste cazuri, numărul de receptori este mai mare decât capacitatea sistemului transductor, de prelucrare a informaţiei.

Receptorii hormonali se află într-o stare dinamică, numărul de receptori per celulă este variabil în raport cu diverşi factori. Nivelul hormonului în sânge poate regla numărul de receptori. Un nivel ridicat prelungit, poate determina diminuarea numărului de receptori (down-regulation). Prin aceasta se realizează o desensibilizare a ţesutului la hormonul specific pentru receptor. În alte cazuri s-a constatat o creştere a numărului de receptori per celulă la o expunere prelungită (up-regulation).

Fenomenul de down-regulation este întâlnit la mulţi hormoni, ca insulină, glucagon, hormon de creştere. Se admite că scăderea numărului de receptori la o stimulare celulară susţinută are loc prin endocitoza complexelor hormon-receptor. Complexele endocitate pot fi degradate intracelular. În alte cazuri, endocitoza este reversibilă. Receptorii din particulele endocitate sunt conservaţi intracelular în vezicule secretorii. La primirea unor semnale externe ei sunt redistribuiţi pe suprafaţa celulelor.

Un alt mecanism sau o altă faţetă a mecanismului de reglare a activităţii receptorilor, a distribuţiei lor celulare, constă în modificarea lor prin fosforilări catalizate de protein kinaze specifice. Mecanismul este aproape general, fiind bine caracterizat în cazul receptorului adrenergic (β-adrenergic). Inactivarea acestui receptor are loc prin fosforilări, la resturi de serină, a complexului hormon-receptor, sub acţiunea unei kinaze specifice (β-adrenergic receptor kinase, β-ARK). Receptorul liber, fără ligand, nu este substrat al enzimei. Complexul hormon-receptor fosforilat este internalizat prin endocitoză. În veziculele endocitice receptorul este defosforilat. Dacă concentraţia hormonului circulant scade, receptorii sunt redistribuiţi în membrana plasmică.

Receptorul insulinei şi receptorii factorilor de creştere (EGF, PDGF) dispun de un alt mecanism de reglare a activităţii lor. Aceşti receptori au activitate intrinsecă de protein kinaze şi, în acelaşi timp, sunt şi substratul acestor enzime. Fixarea hormonului la receptor determină autofosforilarea acestuia din urmă, cu alterarea funcţiei sale (vezi mai departe).

Cu toată diversitatea chimică a hormonilor, a efectelor celulare pe care aceştia le provoacă, a specificităţii înalte pe care o manifestă interacţiunea hormon-receptor, pattern-ul structural al receptorilor este mai limitat. Receptorii pentru mai mulţi hormoni au unele trăsături comune şi sunt grupaţi în familii. Receptorii aparţinând aceleiaşi familii prezintă asemănări structurale şi transmit mesajele externe prin mecanisme transductoare comune.

Cunoştinţele actuale privind natura şi modul de funcţionare a receptorilor permit clasificarea lor în receptori intracelulari (nucleari) şi receptori membranari. Aceştia din urmă sunt grupaţi în două familii, cea a receptorilor înrudiţi cu receptorul adrenergic şi familia receptorilor cu activitate protein kinazică tirozin-specifică.

O primă familie de receptori membranari cuprinde receptorii pentru catecolamine (receptori adrenergici), receptorii pentru acetil-colină de tip muscarinic din muşchii netezi, din celule secretorii, unele subtipuri de receptori pentru serotonină, proteinele fotoreceptoare din retină, ca rodopsina.

Din această familie, receptorul β-adrenergic este cel mai bine cunoscut (Fig. XII.2). Este o proteină transmembranară, cu masa de 64 kD. Capătul N-terminal, extracelular cuprinde două lanţuri oligozaharidice (legate la asparagină). Cuprinde 7 segmente elicoidale, hidrofobe, paralele, înglobate în grosimea membranei. Între elice se află 3 bucle extracelulare şi 3 bucle intracelulare. Segmentul C-terminal intracelular, poate fi fosforilat la resturi seril de o kinază specifică.

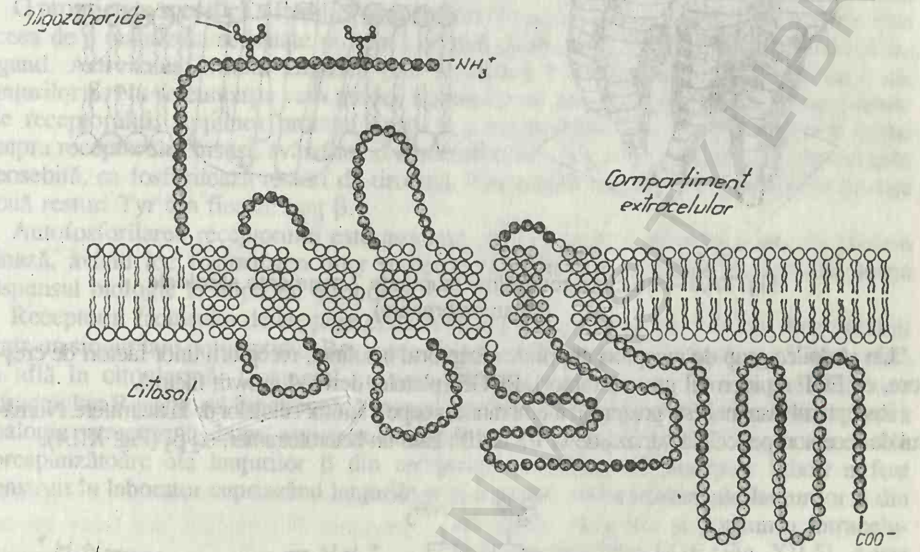


Fig. XII.2 - Receptorul adrenergic (receptor cu 7 elice transmembranare)

Situsul de legare a hormonului este localizat pe faţa externă a receptorului şi este alcătuit dintr-un buzunar între elicele transmembranare. O buclă intracelulară participă la transducerea semnalului extern (prin intermediul proteinei G).

Acetilcolina este neurotransmiţător al neuronilor colinergici. Acetilcolina utilizează două tipuri de receptori, clasificaţi ca receptori nicotinici şi muscarinici, după sensibilitatea lor la nicotină sau muscarină, doi alcaloizi folosiţi ca agonişti în cercetările privind receptorii colinergici. Receptorii de tip nicotinic mediază acţiunile acetilcolinei în neuronii din sistemul nervos central, la joncţiunile neuromusculare din muşchii striaţi. Receptorii de tip muscarinic, pe lângă participarea lor la transmiterea interneuronală a mesajelor, sunt implicaţi în contracţia muşchilor netezi, în secreţia endocrină sau exocrină a unor glande. Receptorii colinergici de tip muscarinic (M_1, M_2, M_3) aparţin familiei de receptori cu cele şapte elice transmembranare (Fig. XII.2).

Rodopsina şi alte proteine fotoreceptoare din retină au structuri asemănătoare receptorilor de tip adrenergic. Rodopsina are o masă moleculară de 40 kD şi cuprinde 7 segmente elicoidale transmembranare (Fig. XII.3). Gruparea cromoforă 11-cis-retinal este plasată în centrul moleculei, între două elice. Rodopsina se aseamănă cu receptorii hormonali nu numai structural ci şi prin mecanismul de transducţie a luminii, semnalul extern, într-un răspuns celular. Rodopsina poate fi fosforilată în regiunea C-terminală, în mod similar cu fosforilarea receptorului adrenergic.

Receptorii din această familie au un mecanism comun de transmitere a mesajului extracelular către maşinăria biochimică a celulei, prin intermediul proteinelor G (vezi mai departe).

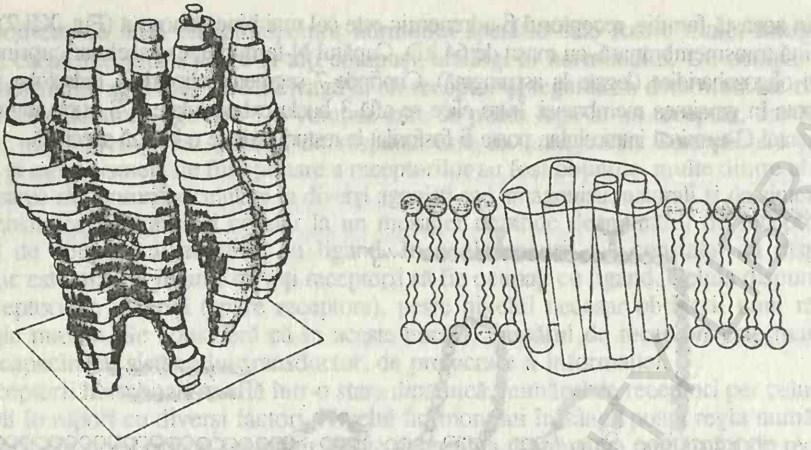


Fig. XII.3 - Structura rodopsinei (cuprinde 7 segmente elicoidale transmembranare)

Un al doilea grup de receptori cuprinde receptorul insulinei, receptorii unor factori de creștere, ca EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor).

Receptorul insulinei este prezent în membrana aproape a tuturor celulelor de la mamifere. Numărul de receptori per celulă variază de la 10^2 la 10^5. Este un heterotetramer, $\alpha_2\,\beta_2$ (Fig. XII.4).

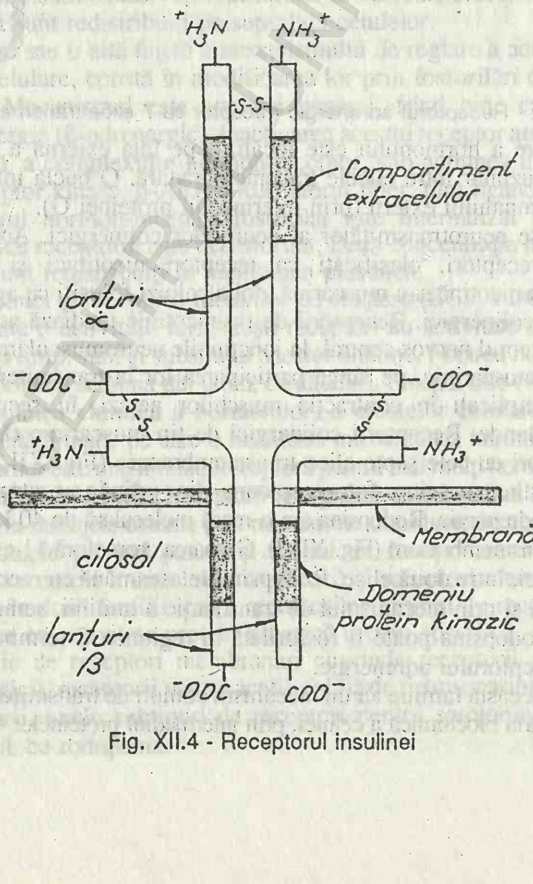


Fig. XII.4 - Receptorul insulinei

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lanţurile α cuprind 719 resturi aminoacidice, cele β 620 resturi. Lanţurile α sunt în totalitate extracelulare. Lanţurile β au segmentele N-terminale extracelulare, câte un segment transmembranar şi capetele C-terminale se află în citoplasmă. Lanţurile α şi β sunt legate prin punţi disulfurice. Receptorul cuprinde un situs de legare a insulinei, constituit din segmente N-terminale ale lanţurilor α. Insulina este specificată de o singură genă, o subunitate αβ este sintetizată ca un lanţ unic, ce cuprinde un peptid semnal N-terminal.

O proprietate specifică a familiei de receptori căreia îi aparţine receptorul insulinei este aceea de a manifesta activitate protein kinazică după ocuparea situsului extracelular cu ligand. Activitatea protein kinazică este localizată în două domenii intracelulare ale lanţurilor β. Nu se cunoaşte cum are loc comunicarea intre cele două regiuni îndepărtate ale receptorului. Acţiunea protein kinazică a receptorului activat se manifestă iniţial asupra receptorului însuşi, având loc o autofosforilare. Specificitatea acestei enzime este deosebită, ea fosforilează resturi de tirozină. Receptorul insulinei este fosforilat la câte două resturi Tyr din fiecare lanţ β.

Autofosforilarea receptorului este asociată cu o creştere a eficienţei sale ca protein kinază, având loc fosforilarea unor proteine celulare care exprimă în cele din urmă răspunsul biologic la impactul hormonal.

Receptorul factorului de creştere epidermal (EGF) are masa de 170 kD. Este alcătuit dintr-un singur lanţ polipeptidic. Regiunea N-terminală este extracelulară, cea C-terminală se află în citoplasmă. Domeniul cu activitate protein kinazică tirozin-specifică este intracelular. Receptorul funcţionează în mod similar cu receptorul insulinic. Există o bună analogie structurală între regiunea intracelulară a receptorului EGF şi domeniile corespunzătoare ale lanţurilor β din receptorul insulinei. Un receptor hibrid a fost construit în laborator cuprinzând lanţurile α şi regiunile extracelulare ale lanţurilor β din receptorul insulinei şi porţiunea intracelulară a receptorului EGF (Fig. XII.5). Acest receptor hibrid este funcţional, legarea insulinei activează protein kinaza receptorului, mecanismul de comunicare între cele două domenii nu a fost alterat.

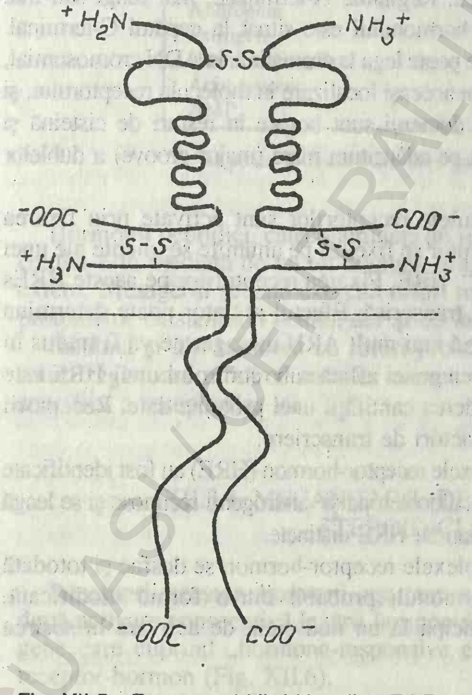


Fig. XII.5 - Receptorul hibrid insulină-EGF

Activitatea protein kinazică tirozin-specifică este întâlnită la receptorii tuturor hormonilor care influenţează creşterea şi diviziunea celulară. Se consideră că acţiunea mitogenă necesită fosforilarea la resturi Tyr a unor proteine reglatoare.

Receptorii nucleari. O categorie distinctă de receptori, prin distribuţie şi prin modul de acţiune, sunt receptorii hormonilor steroidici (progestine, estrogeni, androgeni, corticosteroizi, dihidroxi-D3) şi receptorul hormonului tiroidian. Aceşti hormoni au caracter hidrofob, sunt lipofili şi permează uşor membrana plasmică celulară. Există unele date care susţin ideea că transportul acestor hormoni prin membrana plasmică nu are loc prin simplă difuzie, el putând fi un transport mediat de anumite proteine. În orice caz, pătrunderea hormonului în celulă nu este limitantă pentru

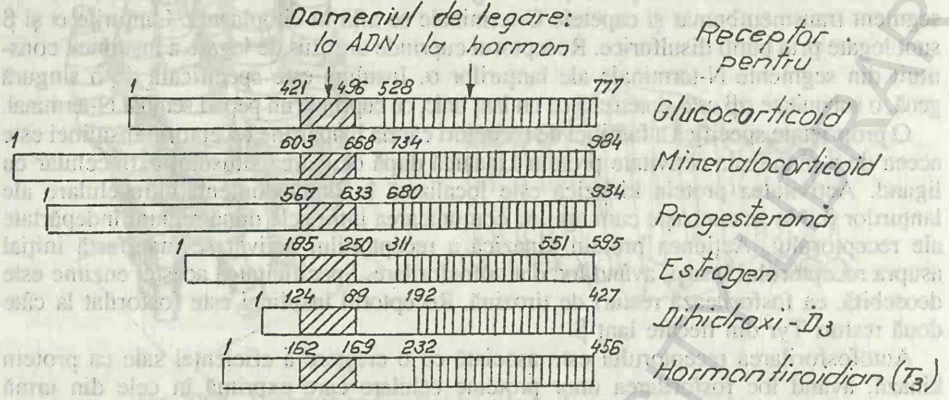


Fig. XII.6 - Receptorii hormonilor steroidici şi tiroidieni

acţiunea sa. Receptorii specifici prin care aceşti hormoni îşi exprimă rolurile lor reglatoare sunt nucleari. Se admite posibilitatea prezenţei receptorilor şi în citoplasmă sau existenţa unor proteine de transport citoplasmatic al hormonilor.

Receptorii pentru aceşti hormoni au fost izolaţi şi caracterizaţi (Fig. XII.6). Sunt proteine cuprinzând câteva sute de resturi aminoacidice. Regiunile N-terminale, mai lungi sau mai scurte, sunt variabile. Domeniul de legare a hormonului este situat la capătul C-terminal. Fiecare receptor posedă un domeniu prin care se poate lega la cromatină, la ADN cromosomial, activând transcrierea acestuia. Aceste regiuni au aceeaşi localizare în molecula receptorului, şi prezintă o înaltă analogie structurală. Aceste domenii sunt bogate în resturi de cisteină şi formează motive structurale care se adaptează pe adâncitura mare (major groove) a dublelor elice de ADN.

Domeniile de legare la ADN din moleculele receptorilor sunt activate prin fixarea hormonului, numai complexele hormon-receptor se fixează pe anumite segmente ale unei gene denumite „hormon-responsive element", HRE. Fixarea receptorilor pe aceste HREs reglează viteza cu care gena respectivă este transcrisă. Efectul reglator poate determina creşterea vitezei de transcriere, se sintetizează mai mult ARN mesager ce va fi tradus în proteina specifică. În unele cazuri transcrierea genei aflată sub controlul unui HRE este încetinită, efectul hormonal constând în scăderea cantităţii unei proteine date. Receptorii activaţi de hormonii specifici operează ca factori de transcriere.

Segmentele de ADN la care se leagă complexele receptor-hormon (HRE) au fost identificate (Tabelul XII.2). Glucocorticoizii, progesterona, aldosterona şi androgenii recunosc şi se leagă la acelaşi HRE. Estrogenii şi hormonul tridoidian au HRE distincte.

Efectele hormonale sunt tranzitorii. Complexele receptor-hormon se desfac şi totodată receptorul se detaşează de pe ADN. Hormonul, probabil într-o formă modificată, difuzează din celulă. Receptorul poate participa la un nou ciclu de activare la sosirea semnalului în celulă.

XII.3. MECANISMELE DE ACŢIUNE A HORMONILOR

Funcţiile reglatoare ale hormonilor la nivel celular se exercită prin modularea activităţii unor proteine, de cele mai multe ori enzime, proteine de transport, proteine contractile, canale ionice etc. Aceste proteine, ţinta unuia sau a mai multor hormoni, prezintă activităţi fie ca urmare a unor modificări cantitative, fie prin conversia lor în forme cu proprietăţi diferite.

Hormonii steroidici şi tiroidieni, cu receptori nucleari, acţionează direct asupra cromatinei, asupra ADN, activând (sau încetinind) transcrierea genelor. Acţiunea hormonului se manifestă direct în creşterea (sau diminuarea) vitezei de sinteză a unor proteine.

Tabelul XII.2.

Secvenţele de ADN care alcătuiesc HREs (hormone responsive elements) pentru diverşi hormoni

Hormonii	*Structura HRE*
Glucocorticoizi	GGTACAnnnTGTTCT
Progestine	GGTACAnnnTGTTCT
Mineralocorticoizi	GGTACAnnnTGTTCT
Androgeni	GGTACAnnnTGTTCT
Estrogeni	AGGTCAnnnTGA$_T$CCT
Hormoni tiroidieni	GATCAnnnnnTGACC
Acid retinoic	GATCAnnnnnTGACC
AMP$_c$	TGACGTCA

n poate fi oricare din cele patru baze.

Hormonii peptidici, catecolaminele au receptori membranari, acţiunea lor în interiorul celulei este mediată de un alt compus (mesager secund) format ca răspuns la semnalul extern. Mesagerul secund exercită roluri reglatoare, care pot fi de modulare a activităţii proteinelor existente în celulă, dar şi de inducţie a sintezei de noi molecule proteice.

Insulina şi alţi hormoni cu roluri proliferative celulare (hormoni mitogeni) exercită roluri reglatoare al căror numitor comun pare a fi activitatea protein kinazică tirozin-specifică a receptorilor lor.

XII.3.1. MECANISMUL DE ACŢIUNE A HORMONILOR STEROIDICI ŞI TIROIDIENI

Receptorii acestor hormoni, aşa cum s-a arătat mai înainte, sunt nucleari şi aceştia, după activare consecutivă legării hormonului, acţionează ca factori de transcriere pentru gene care cuprind „hormone-responsive elements" (HRE) recunoscute de complexele receptor-hormon (Fig. XII.6).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul XII.3.

Reglarea expresiei unor gene de către hormoni steroizi şi hormoni tiroidieni (↓ expresia genei este diminuată de hormon)

Glucocorticoizi	
Tirozinaminotransferaza	Ficat
Triptofan oxigenaza	Ficat
Glutamin sintetaza	Ficat
Transferină	Ficat
α-Fetoproteină ↓	Ficat
$\alpha_{2\mu}$-Globulină	Ficat
Metalotioneină	Ficat
Ovalbumină	Oviduct (pasăre)
Proopiomelanocortină ↓	Adenohipofiză
Estrogeni	
Ovalbumină	Oviduct (pasăre)
Apo B-VLDL	Ficat
Glucozo-6-P dehidrogenază	Uter
Progesteronă	
Ovidina	Oviduct (pasăre)
Ovalbumina	Oviduct (pasăre)
Uteroglobina	Uter

Efectul inductor al hormonilor steroidici asupra sintezei unor proteine poate fi observat asupra organismelor întregi. Astfel, este foarte bine cunoscută acţiunea proliferativă a estrogenilor şi progesteronei asupra uterului la mamifere sau asupra oviductului la păsări. Totodată, au fost identificate numeroase proteine a căror sinteză este crescută (uneori diminuată) sub acţiunea acestor hormoni (Tabelul XII.3).

Hormonii tiroidieni, pe lângă inducţia sintezei unor proteine specificate de gene nucleare, au capacitatea de a activa sinteza unor proteine specificate de genomul mitocondrial, proteine care participă la procesele oxidative mitocondriale.

XII.3.2. MECANISMUL DE ACŢIUNE A HORMONILOR PEPTIDICI ŞI A CATECOLAMINELOR

Hormonii din această grupă au receptorii situaţi pe suprafaţa celulelor, ei nu pătrund în celulă. Fixarea hormonului pe receptor activează un sistem transductor care transformă semnalul extern (mesagerul prim, hormonul), într-un semnal intracelular (mesager secund). Mesagerul secund exercită acţiuni reglatoare care constituie răspunsul celulei ţintă la hormon.

În 1950 Earl Sutherland a descoperit nucleotidul ciclic 3',5'-AMP (AMP_c) şi că acest compus este mediatorul intracelular al adrenalinei în hepatocite. Acţiunea glicogenolitică a adrenalinei poate fi mimată de AMP_c.

Studiile care au urmat au arătat că acţiunile altor hormoni sunt mediate intracelular de AMP_c (Tabelul XII.4). Totodată, după fundamentarea conceptului de acţiune hormonală mediată de un mesager secund, au fost descoperiţi şi alţi compuşi care

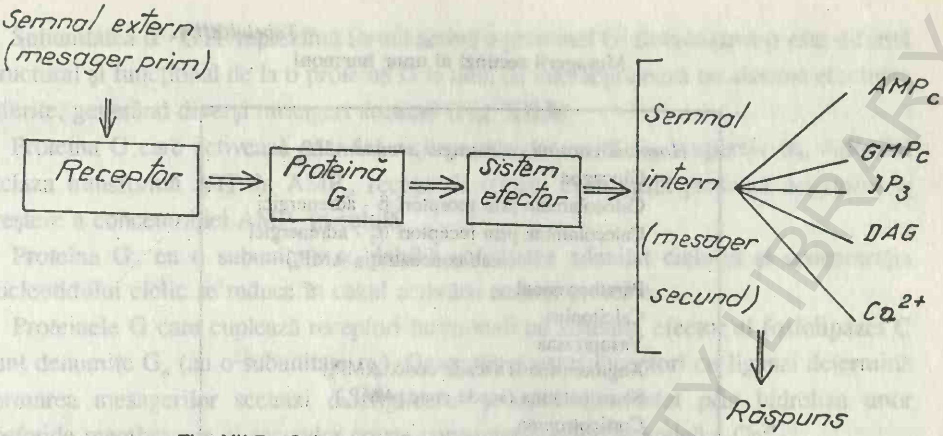


Fig. XII.7 - Schema generală a mecanismului de acţiune a hormonilor cu receptori membranari

îndeplinesc această funcţie: 3', 5'-GMP (GMP_c). Ca^{2+}, diacilglicerol, inozitoltrisfosfat şi alţii. Cu toată varietatea foarte mare a hormonilor, totuşi, numărul mesagerilor intracelulari este mult mai redus. Mai mulţi hormoni utilizează acelaşi mesager secund.

Mecanismul de acţiune a hormonilor mediat prin mesageri secunzi, presupune existenţa unor sisteme transductoare care după receptarea semnalului să îl prelucreze, să îl transmită unor sisteme efectoare, care să dea naştere moleculei cu rol de mesager secund. Aceste sisteme mesageriale cuprind (Fig. XII.7):

a) receptorul hormonal;

b) un sistem de cuplare a complexului receptor-hormon cu sistemul efector; funcţia de cuplare a receptorilor cu sistemele efectoare aparţine unei familii de proteine, denumite proteine G;

c) un sistem efector care să genereze mesagerul secund,intracelular; există mai multe sisteme efectoare care produc diverşi mesageri secunzi;

d) acţiunea mesagerului secund asupra unei sau mai multor proteine ţintă care determină răspunsul biologic la impactul hormonal.

În Tabelul XII.4. sunt prezentaţi hormonii şi mesagerii intracelulari care le mediază răspunsurile. Receptorii acestor hormoni au structuri asemănătoare cu a receptorilor adrenergici, aparţin unei familii de proteine cunoscute ca proteine cu şapte elice membranare (vezi mai sus).

Proteinele G

Sunt proteine membranare care cuplează funcţional receptorii hormonali de sistemele celulare generatoare de mesageri secunzi. Aceste proteine au proprietatea de a lega nucleotide cu guanină (GDP sau GTP), de unde denumirea de proteine G. Reprezintă o familie de proteine heterotrimerice cu structura $\alpha\beta\gamma$. Lanţurile β (35-36 kD) şi γ (7-10 kD) sunt puţin diferite de la o proteină G la alta. Individualitatea unei proteine G îi este conferită de subunitatea α (41-45 kD).Situsul de legare a nucleotidului cu guanină este localizat pe lanţul α. Forma inactivă a unei proteine G este GDP - $\alpha\beta\gamma$.

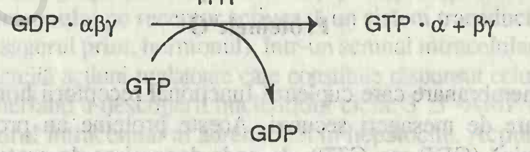
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul XII.4.

Mesagerii secunzi ai unor hormoni

Hormoni care au ca mesager secund AMP_c
Glucagon
Catecolamine prin receptori β - adrenergici
Catecolamine prin receptori α_2 - adrenergici (scad concentraţia AMP_c)
Parathormonul
Calcitonina
Vasopresina
Angiotensina II (scade conc. AMP_c)
Somatostatina (scade conc. AMP_c)
Corticotropina
FSH
LH
CRH (hormonul eliberator al corticotropinei)
TSH
Hormoni care au mesager secund GMP_c
Factorul atrial natriuretic (ANF)
Rodopsina
Hormoni care au ca mesager secund Ca^{2+}, IP_3 şi/sau diacilglicerol
Catecolamine prin receptori α_1-adrenergici
Acetilcolina prin receptori muscarinici
Gastrina
Colecistokinina
Oxitocina
Hormonul eliberator al gonadotropinelor (GnRH)

Proteinele G interacţionează cu receptorii membranari după fixarea hormonului la aceştia. Complexele receptor-hormon acţionează în mod *catalitic* asupra unei proteine G cu care este cuplat receptorul şi determină schimbul dintre GDP legat la subunitatea α şi GTP din mediu. Concomitent cu acest schimb are loc disocierea GTP· α de dimerul βγ.



Acţiunea complexului H·R asupra proteinei G este catalitică, o moleculă de complex H·R determină schimbul GDP-GTP pe multe molecule de proteină G, ceea ce constituie un moment de amplificare a semnalului hormonal.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Subunitatea α · GTP reprezintă forma activă a proteinei G. Subunitatea α este diferită structural şi funcţional de la o proteină G la alta, ea interacţionează cu sisteme efectoare diferite, generând diverşi mesageri secunzi (Fig. XII.8).

Proteina G care activează adenilat ciclaza este denumită G_S, respectiv α_S. Adenilat ciclaza transformă ATP în AMP_c, receptorii cuplaţi cu această proteină determină o creştere a concentraţiei AMP_c în celulă.

Proteina G_i, cu o subunitate α_i, inhibă activitatea adenilat ciclazei şi concentraţia nucleotidului ciclic se reduce în cazul activării acestei proteine.

Proteinele G care cuplează receptori hormonali cu sistemul efector al fosfolipazei C sunt denumite G_p (au o subunitate α_p). Ocuparea acestor receptori cu liganzi determină formarea mesagerilor secunzi diacilglicerol şi inozitoltrisfosfat prin hidroliza unor fosfatide membranare şi secundar creşte concentraţia citoplasmatică a Ca^{2+}.

Rodopsina, proteina fotoreceptoare din celule retiniene (conuri), este cuplată cu o proteină aparţinând familiei G denumită transducină.

Există multe alte proteine G ale căror identitate şi funcţie sunt în curs de precizare. Pentru acestea se foloseşte denumirea de G_o (o de la others).

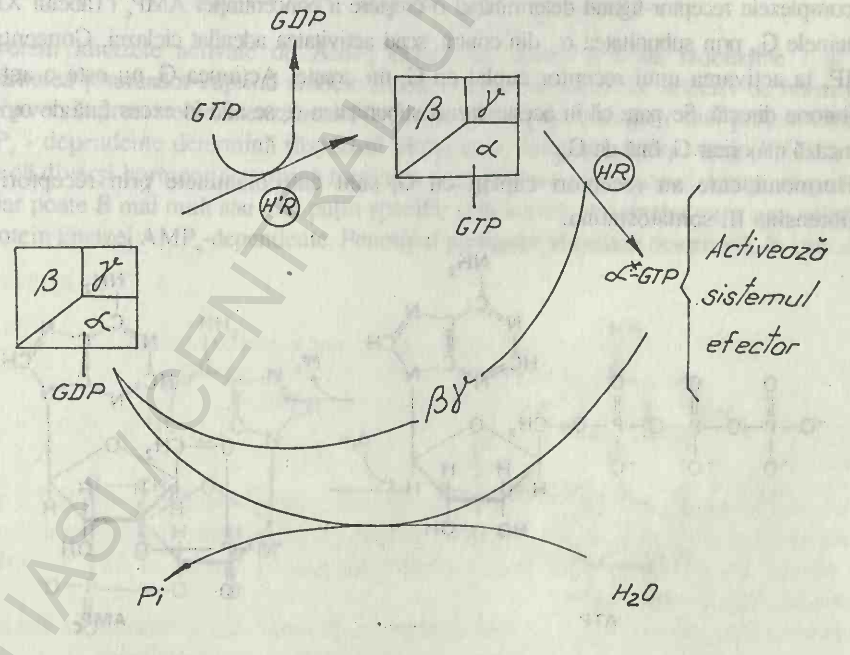
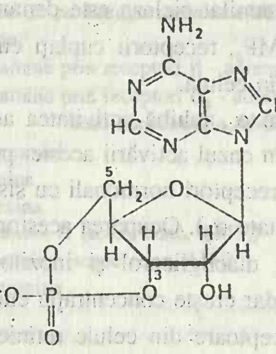


Fig. XII.8 - Ciclul catalitic al unei proteine G (G_s)

AMP_c adenilat ciclaza şi AMP_c - fosfodiesteraza

3',5'-Adenozinmonofosfatul (AMP_c), mesagerul secund al multor hormoni, are structura:



Concentraţia sa celulară este foarte mică. Un semnal hormonal determina însă creşteri semnificative ale concentraţiei sale. AMP_c este sintetizat din ATP sub acţiunea adenilat ciclazei (Fig. XII.9). Adenilat ciclaza este prezentă la toate organismele, de la bacterii până la om. În celule eucariote este situată în membrana plasmică, pe faţa citoplasmică şi este cuplată funcţional cu proteine G, de tipul G_s sau G_i. Proteinele G_s, prin subunitatea GTP $\cdot$ α_s au acţiune stimulatoare asupra adenilat ciclazei, interacţiunea acestor proteine cu complexele receptor-ligand determinând o creştere a concentraţiei AMP_c (Tabelul XII.4). Proteinele G_i, prin subunitatea α_i, din contră, scad activitatea adenilat ciclazei. Concentraţia AMP_c la activarea unui receptor cuplat cu G_i nu creşte. Acţiunea G_i nu este o acţiune inhibitorie directă. Se pare că în aceste cazuri subunitatea α_i se află în exces faţă de α_s şi se formează majoritar G_i faţă de G_s.

Hormonii care au receptori cuplaţi cu G_i sunt catecolaminele prin receptori α_2, angiotensina II, somatostatina.

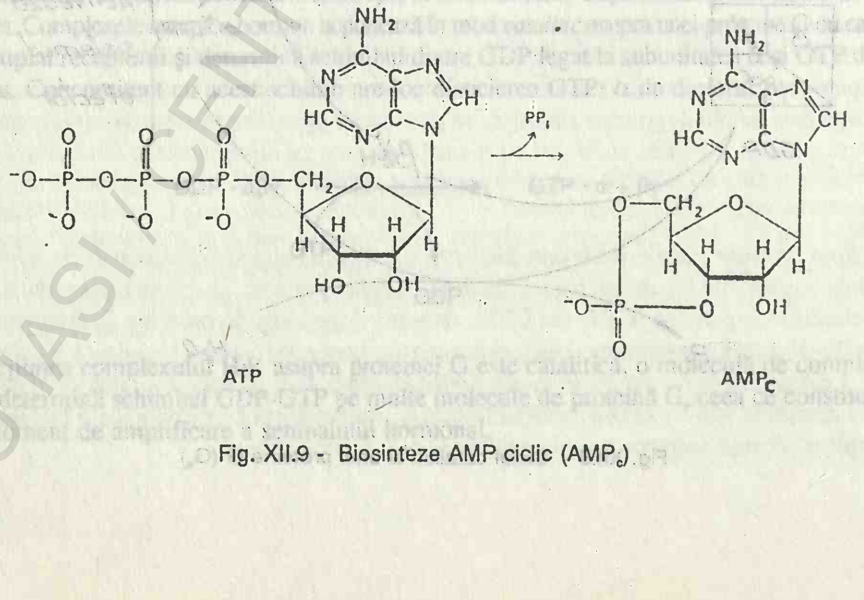


Fig. XII.9 - Biosinteze AMP ciclic (AMP_c)

Acţiunile biologice iniţiate de AMP_c sunt de scurtă durată deoarece acest compus este rapid descompus prin hidroliză la 5'-AMP (Fig. XII.10). Enzima care catalizează reacţia este 3',5'-AMP_c fosfodiesterază. Există mai multe izoforme ale fosfodiesterazei, larg răspândite. În vivo, activitatea acestor enzime este controlată de diverşi factori, viaţa biologică a mesagerului secund AMP_c depinzând atât de activitatea adenilat ciclazei, cât şi de cea a fosfodiesterazelor. Două substanţe, cafeina şi teofilina, principiile active din cafea şi ceai, au acţiuni inhibitorii asupra AMP_c fosfodiesterazei. Prin menţinerea AMP_c la un nivel ridicat un timp mai îndelungat, ele mimează acţiunea unor hormoni care cresc concentraţia AMP_c. Mulţi alţi compuşi modulează activitatea fosfodiesterazei in vivo.

Protein kinaze şi fosfoprotein fosfataze

AMP_c, mesagerul secund al multor hormoni, are ca mecanism de acţiune activarea unor protein kinaze. Familia de protein kinaze activate de AMP_c sunt cunoscute ca protein kinaze A (subgrupa I şi II). Ele au specificitate pentru resturi de serină (Ser) sau treonină (Thr). Prin acţiunea protein kinazelor asupra unor proteine (enzime) are loc conversia în forme fosforilate cu activităţi distincte de cele ale formelor defosfo.

Protein kinazele A au o structura heterotetramerică R_2C_2. Subunităţile R sunt reglatoare, iar cele C sunt catalitice. Tetramerul este inactiv, centrele active ale subunităţilor catalitice sunt mascate. AMP_c se leagă la subunităţile R din tetramer (o subunitate are două situsuri de legare) şi eliberează subunităţile catalitice:

$$R_2C_2 + 4\,AMP_c \rightleftharpoons 2\,C + R_2(4\,AMP_c)$$

Protein kinazele activate de AMP_c există sub formă a două izoenzime I şi II. Majoritatea ţesuturilor cuprind ambele forme şi ele sunt stimulate selectiv de hormoni.

Conversia proteinelor, a enzimelor, în forme fosfo, prin activarea unei protein kinaze AMP_c - dependente determină răspunsul biologic la semnalul extern. (Fig. XII.11). Cu toate că diverşi hormoni determină formarea aceluiaşi mesager secund, totuşi, răspunsul celular poate fi mai mult sau mai puţin specific prin natura proteinelor care sunt substrat al protein kinazei AMP_c-dependente. Fenotipul particular al celulei determină, în cele din

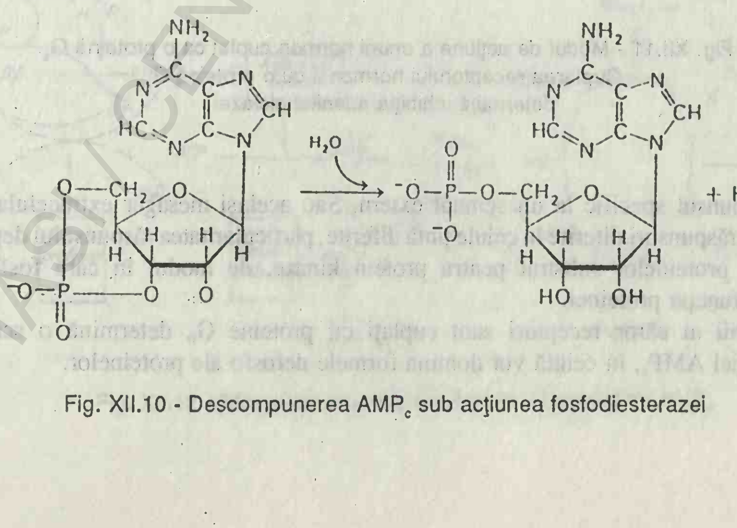


Fig. XII.10 - Descompunerea AMP_c sub acţiunea fosfodiesterazei

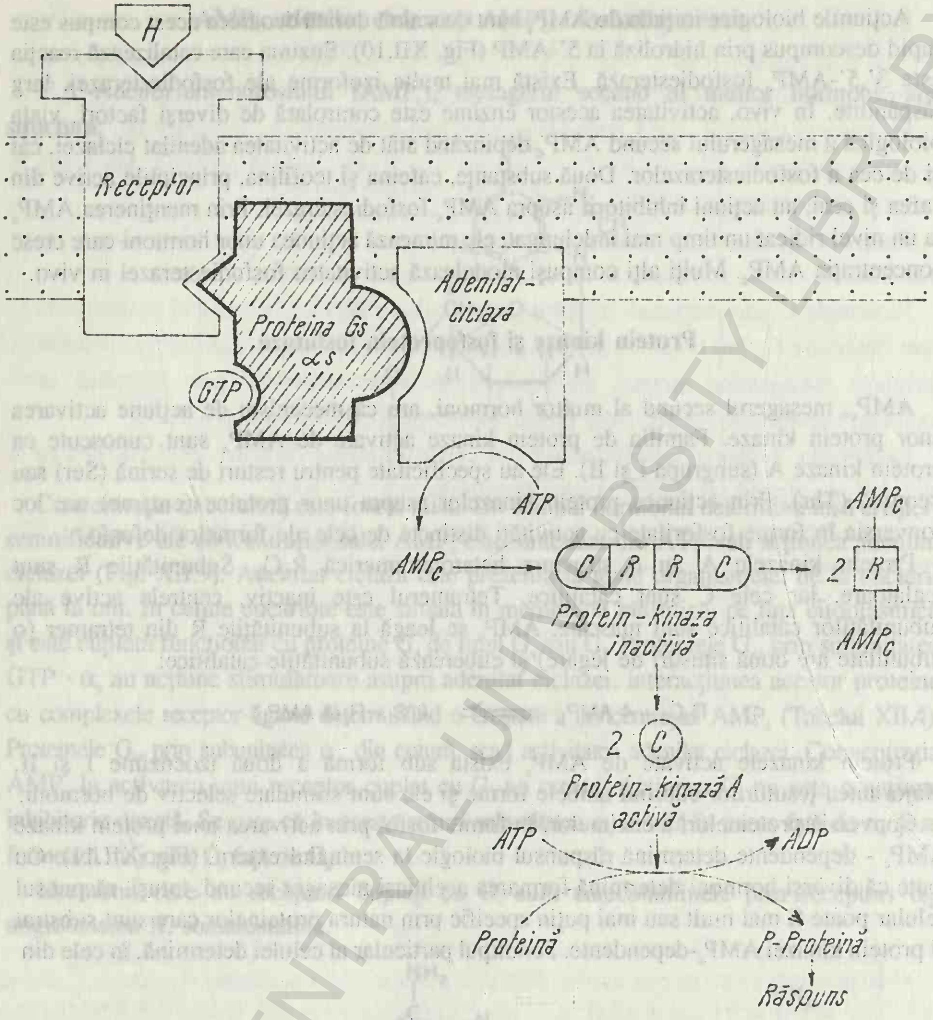


Fig. XII.11 - Modul de acţiune a ununi hormon cuplat cu o proteină G_s. Cuplarea receptorului hormonal cu o proteină G_i determină inhibiţia adenilat ciclazei

urmă, răspunsul specific la un semnal extern. Sau acelaşi mesager extracelular poate determina răspunsuri diferite în celule ţintă diferite, particularitatea răspunsului depinzând de natura proteinelor substrat pentru protein kinaze, de modul în care fosforilarea afectează funcţia proteinei.

Hormonii ai căror receptori sunt cuplaţi cu proteine G_i, determină o scădere a concentraţiei AMP_c, în celulă vor domina formele defosfo ale proteinelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Protein fosfataze. Stingerea răspunsului iniţiat de un hormon care determină o creştere a nivelului celular de AMP_c are loc în mai multe moduri (Fig. XII.12). Autohidroliza GTP din $\alpha_s \cdot$ GTP şi inactivarea proteinei G întrerupe transmiterea mesajului de la receptor la adenilat ciclază. Fosfodiesteraza descompune mesagerul AMP_c şi opreşte fluxul de informaţie la acest nivel. În sfârşit, o altă modalitate de stingere a unui răspuns hormonal este acela de a defosforila proteinele fosforilate de protein kinazele A, de convesie a acestora la starea anterioară recepţării mesajului extern. Defosforilarea proteinelor este catalizată de protein fosfataze:

$$\text{P-proteină} + H_2O \longrightarrow \text{Defosfoproteină} + P_i$$

Protein fosfatazele au deci roluri importante în exprimarea efectelor hormonilor la nivel celular. Aceste enzime prezintă multiple izoforme şi sunt ele înşile ţinta a diverse mecanisme reglatoare, unele hormonale. Prezintă specificităţi distincte pentru legături fosforil-Ser, fosforil-Thr şi fosforil-Tyr.

Fosforilarea sau defosforilarea afectează activitatea proteinelor în moduri foarte variate:

- măreşte sau micşorează activitatea catalitică a unei enzime (de exemplu glicogen fosforilaza este activă ca P-enzimă; glicogen sintaza este activă în formă defosfo);
- modifică sensibilitatea unei enzime faţă de efectori;
- dacă proteina convertită prin fosforilare este ea însăşi o kinază are loc o amplificare în cascadă a unui semnal iniţial (de exemplu glicogen fosforilazokinaza);
- fosforilarea poate modifica concentraţia unor metaboliţi reglatori (de exemplu concentraţia fructozo-2, 6-bisfosfat, reglator al glicolizei şi al gluconeogenezei).

În afara rolurilor mai bine cunoscute de reglare a unor secvenţe metabolice, ciclul fosforilare-defosforilare a proteinelor intervine în multe alte procese, diviziune celulară, transcrierea şi traducerea genelor, permeabilitatea membranară.

Au fost identificate multe enzime şi alte proteine care suferă conversia defosfo ⇄ fosfo într-un proces dependent de AMP_c. Prin acest mecanism sunt controlate procese fundamentale ca glicogenoliza şi sinteza de glicogen, glicoliza şi gluconeogeneza, oxidarea şi biosinteza acizilor graşi. Creşterea concentraţiei AMP_c în ficat, muşchi, ţesut adipos, determină conversia spre formele fosfo a enzimelor cheie implicate în aceste procese având ca rezultat accelerarea lor. Aceste procese furnizează organismului substrate oxidabile pe seama rezervelor. AMP_c este cunoscut ca semnal al foamei (hunger signal).

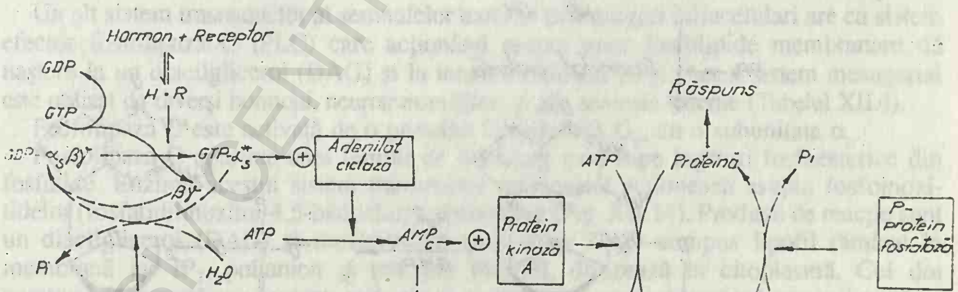


Fig. XII.12 - Stingerea unui răspuns hormonal mediat de AMP_c

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hormonii care scad concentraţia AMP_c, fac să predomine formele defosfo ale unor enzime şi determină deplasarea metabolismului spre procese anabolice, de depozitare a glicogenului, a lipidelor. Mecanismele moleculare de reglare a acestor procese sunt descrise mai departe.

AMP_C mediator al expresiei genice

Hormonii care utilizează AMP_c ca mesager secund pot acţiona şi prin inducţia sintezei de proteine. Intr-adevăr multe efecte hormonale mediate de acest nucleotid ciclic sunt rezultatul creşterii concentraţiei de proteine specifice.

Această acţiune poate avea loc prin conversia fosforilare ⇄ defosforilare a unor proteine ce participă la transcrierea sau traducerea unor gene.

Totuşi, cercetări mai noi au permis implicarea AMP_c ca factor de transcriere, în mod asemnănător mecanismului de acţiune a hormonilor steroidici. S-a identificat o proteină care, pe de o parte leagă AMP_c şi pe de alta interacţionează un segment de ADN specific (hormone responsive element). Acest HRE are structura TGACGTCA.

GMP_C, guanilat ciclaza şi GMP_C fosfodiesteraza

Nucleotidul ciclic 3' 5'-GMP are o structură asemănătoare cu a 3' 5'-AMP. De asemenea, el este sintetizat şi descompus prin reacţii similare catalizate de guanilat ciclază şi de GMP_c fosfodiesterază (Fig. XII.13). GMP_c funcţionează ca mesager intracelular al unor hormoni. În multe cazuri GMP_c antagonizează efectele AMP_c.

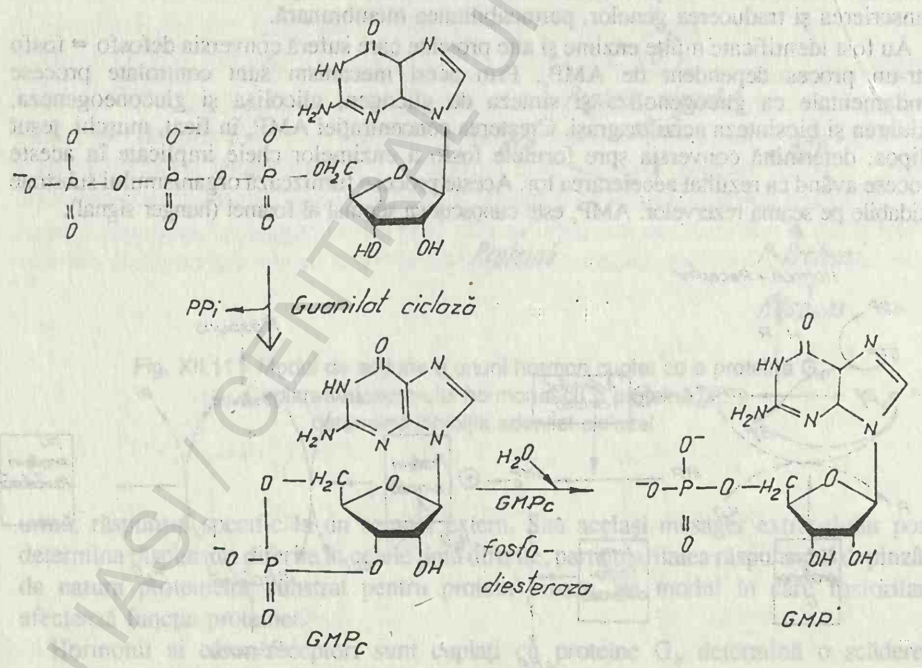


Fig. XII.13 - Sinteza şi degradarea GMP_c

Guanilat ciclaza a fost indentificată în multe celule şi există, cel puţin, în două izoforme, una membranară şi una citoplasmatică. Guanilat ciclaza membranară are o funcţie dublă, îndeplineşte atît funcţia de receptor (domeniul extracelular) al semnalului extern cât şi funcţia de sistem efector care generează mediatorul intracelular. Domeniul intracelular are activitatea guanilat ciclazică care se manifestă după ocuparea situsului receptor.Hormonii recunoscuţi de acest receptor determină o creştere a concentraţiei intracelulare de GMP_c. GMP_c, prin intermediul unei protein kinaze şi a unei cascade de fosforilare induce răspunsul celular.

Un hormon care acţionează prin activarea guanilat ciclazei membranare este factorul atrial natriuretic (ANF sau natriopeptină). Acest hormon este un peptid cu 28 aminoacizi (la om). Este secretat de celule cardiace atriale la diverse semnale. Acţiunile sale la nivelul rinichiului, al medulosuprarenalelor (zona glomerulară) are ca efect creşterea volumului urinar, creşterea eliminării de Na^+, scăderea secreţiei de renină, de aldosteronă.

La nivel molecular, ANF stimulează guanilat ciclaza membranară în celulele ţintă, are loc o creştere a GMP_c şi relaxarea muşchilor netezi.

Guanilat ciclaza citoplasmatică, solubilă, este sistemul efector pentru oxidul de azot (NO).Acest compus a fost identificat cu endothelium-derived relaxing factor (EDRF), este produs şi acţionează ca hormon paracrin asupra multor celule, este un factor reglator al presiunii sanguine, mediază citotoxicitatea, este implicat în neurotransmisie.

Oxidul de azot este sintetizat de un sistem enzimatic cu funcţie oxidazică - NO sintetaza - din aminoacidul arginină. Oxidul de azot activează în celule ţintă guanilat ciclaza citoplasmatică. GMP_c format, mediază relaxarea muşchilor netezi.

GMP_c este mediatorul semnalelor luminoase în celulele retiniene, conuri şi bastonaşe. În aceste celule, GMP_c acţionează asupra unor canale pentru Na^+, le menţine în stare deschisă. Un semnal luminos receptat de rodopsină, prin intermediul unei proteine din familia G, transducina, determină activarea GMP_c fosfodiesterazei şi are loc scăderea concentraţiei intracelulare a GMP_c. Rezultatul acestui fapt este închiderea canalelor pentru Na^+, creşte concentraţia lor intracelulară şi are loc o hiperpolarizare a membranei care se va constitui în senzaţia de lumină.

Fosfolipaza C şi mesagerii intracelulari diacilglicerol şi inozitoltrisfosfat

Un alt sistem trasnsductor al semnalelor externe în mesageri intracelulari are ca sistem efector fosfolipaza C (PLC) care acţionând asupra unor fosfolipide membranare dă naştere la un diacilglicerol (DAG) şi la inozitoltrisfosfat (IP_3). Acest sistem mesagerial este utilizat de diverşi hormoni, neurotransmiţători şi alte semnale externe (Tabelul XII.4).

Fosfolipaza C este activată de o proteină G denumită G_p, cu o subunitate α_p.

Fosfolipaza C aparţine unei familii de hidrolaze care rupe legături fosfoesterice din fosfatide. Enzima acestui sistem transductor mesagerial acţionează asupra fosfoinozitidelor (fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat) membranare (Fig. XII.14). Produşii de reacţie sunt un diacilglicerol (DAG) şi inozitoltrisfosfatul (IP_3). DAG compus lipofil rămâne în membrană iar IP_3, polianion şi puternic hidrofil, difuzează în citoplasmă. Cei doi compuşi, împreună sau separat, acţionează ca mesageri secunzi pentru hormonii ai căror receptori sunt cuplaţi cu proteine G_p.

Diacilglicerolul activează proteinkinaza de tip C. Această enzimă are specificitate pentru resturi Ser sau Thr, dar este distinctă de protein kinazele A, activate de AMP_c. Protein kinaza C prezintă mai multe izoforme. Unele sunt activate numai de DAG, altele necesită pentru activitate catalitică deplină pe lângă DAG şi ioni Ca^{2+}. Proteinele fosforilate de aceste kinaze exprimă efectul biologic al hormonului (Fig. XII.15).

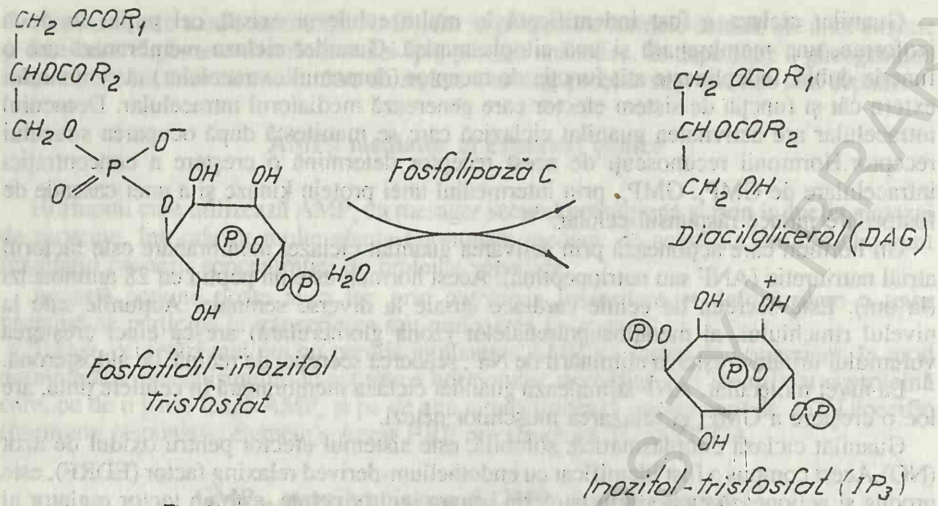


Fig. XII.14 - Formarea mesagerilor secunzi diacilglicerol (DAG) şi inozitoltrisfosfat (IP_3) sub acţiunea fosfolipazei C

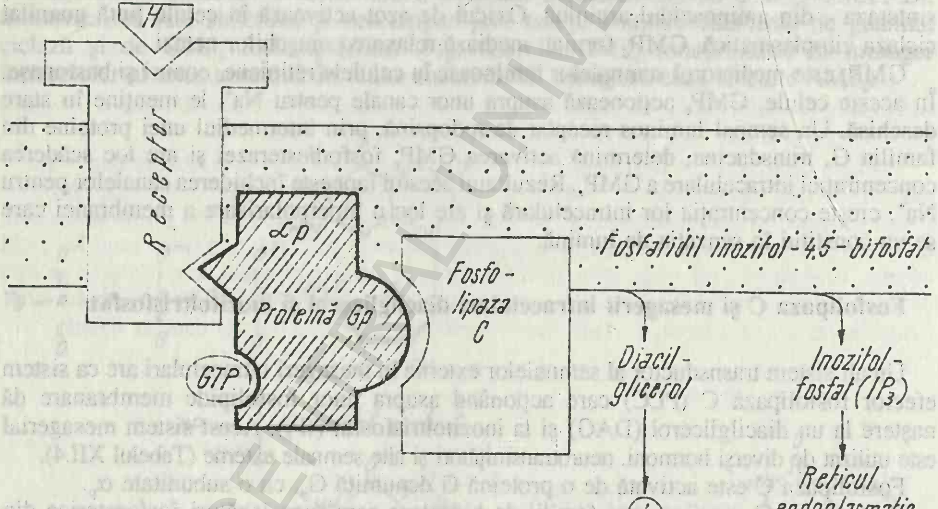


Fig. XII.15 - Modul de acţiune a unui hormon cuplat cu o proteină G_p, activator al fosfolipazei C

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Inozitoltrisfosatul, celălalt produs al reacţiei PLC, acţionează asupra membranei reticulului endoplasmic (reticul sarcoplasmic) determinând o creştere pronunţată a concentraţiei Ca^{2+} citoplasmic (sarcoplasmic). Această membrană cuprinde canale cationice deschise de IP_3. Ionii Ca^{2+} sunt molecule semnal pentru multe proteine, enzime, diverse procese celulare. Ionii Ca^{2+} în asociere cu DAG sau independent de acesta, activează protein kinaze C, efectul hormonal fiind rezultatul conversiei defosfoproteină $\rightleftharpoons$ fosfoproteină.

Răspunsul celular la stimuli externi care activează fosfolipaza C se sting prin reciclarea DAG şi IP_3.

Diacilglicerolul poate fi utilizat pe diverse căi. Poate fi transformat într-un fosfatid şi reinserat în stratul dublu lipidic membranar. Poate fi substrat pentru fosfolipaza A_2, care scindează hidrolitic legătura carboxil esterică de la C_2. Acidul gras din această poziţie este frecvent acid arahidonic, eliberarea sa iniţiază evenimente care duc la sinteza de prostaglandine, leucotriene.

Inozitoltrisfosfatul are o viaţă scurtă, el dă naştere la diverşi metaboliţi prin fosforilare şi defosforilări selective. Aceşti metaboliţi ai IP_3 au, mulţi dintre ei, roluri biologice importante.

Dintre moleculele semnal care utilizează ca mesager intracelular IP_3 este acetilcolina prin receptori de tip muscarinic (subtipul M_3). Astfel de receptori mediază efectele acetilcolinei asupra muşchilor netezi, secreţia unor glande endocrine sau exocrine. IP_3 determină creşterea concentraţiei Ca^{2+} citoplasmatic pe seama rezervelor intracelulare. Ionii Ca^{2+} în muşchii netezi activează o kinază, componentă a lanţului uşor din miozină (myosin light chain kinase, MLCK), care autofosforilează miozina. Această fosforilare este urmată de interacţiunea actină-miozină, de contracţie.

Ca^{2+} mesager intracelular al semnalelor externe

Ionii Ca^{2+} mediază efectele intracelulare ale multor hormoni sau a unor semnale nervoase. Ionii Ca^{2+} reglează contracţia muşchilor striaţi şi netezi, controlează secreţiile exocrine, endocrine, au un rol deosebit în diviziunile celulare, sunt modulatori ai multor procese metabolice fundamentale.

Concentraţia citosolică a Ca^{2+} în repaos este foarte mică. Pentru o celulă de la mamifere aceasta este de ordinul a 10^{-7}-10^{-6}M. Această concentraţie mică contrastează cu nivelul calciului extracelular (~ 10^{-3}M) ceea ce crează un gradient de concentraţie foarte pronunţat (de câteva ordine de mărime) între cele două compartimente. Concentraţia mică a Ca^{2+} în citoplasmă este menţinută prin funcţionarea unor mecanisme care scot Ca^{2+} din celulă (pompe de Ca^{2+}), prin permeabilitatea naturală foarte mică a membranelor pentru cationi, prin funcţionarea unor mecanisme care depozitează Ca^{2+} în mitocondrii şi reticul endoplasmic (reticul sarcoplasmic în muşchi).

Nivelul scăzut al Ca^{2+} în citoplasmă previne formarea de fosfaţi de calciu greu solubili (anionii fosfat sunt prezenţi în celule în cantităţi mari). Totodată, pornindu-se de la un nivel foarte scăzut este uşor de realizat o creştere rapidă şi substanţială a concentraţiei citosolice a Ca^{2+}. Oscilaţii de mare amplitudine ale concentraţiilor intracelulare sunt caracteristice compuşilor cu roluri mesageriale. AMP_c, IP_3 şi alţi mesageri prezintă modificări de concentraţie prin apariţia şi dispariţia lor în reacţii enzimatice. Ionul de

Ca^{2+} este o entitate chimică permanentă, numai prin deplasări între diverse compartimente poate fi modulată concentraţia sa.

Creşterea concentraţiei Ca^{2+} în citoplasmă are loc prin pătrunderea cationului din fluidul extracelular sau prin eliberarea sa din reticulul endoplasmic. Depozitul de calciu din mitocondrii intervine doar în tamponarea variaţiilor pe termen lung ale calciului citosolic.

Răspunsurile mediate de Ca^{2+} sunt unele foarte rapide şi de scurtă durată, pe când altele se instalează mai încet şi durează mai mult. Răspunsurile rapide (de ordinul milisecundelor) sunt mediate de influxul Ca^{2+} din exterior după stimulări electrice. Modificările de concentraţie a Ca^{2+} mai lente şi prelungite au loc prin deschiderea de canale care sunt controlate de anumiţi liganzi.

Ca^{2+} funcţionează ca mesager împreună cu AMP_c, GMP_c, DAG sau IP_3 sau independent de aceştia.

Calmodulina. Rolurile reglatoare ale Ca^{2+} sunt mediate de proteine specifice de legare a cationului. O proteină cu această funcţie, prezentă în toate celulele eucariote este calmodulina. Este o proteină mică, cuprinde 148 aminoacizi; restul Lys din poziţia 115 este purtătorul unei grupări cuaternare de amoniu $\overset{+}{N}(CH_3)_3$. Proteina este alcătuită dintr-un segment linear elicoidal şi două domenii terminale globulare (Fig. XII.16). Fiecare domeniu globular posedă câte două situsuri de legare a Ca^{2+}. Calmodulina fixează până la 4 Ca^{2+}/moleculă. Un ion de Ca^{2+} realizează 6-8 legături coordonative la care participă grupări $-COO^-$ din resturi Asp şi Glu, grupări >C=0 din legătura peptidică şi molecule de apă.

Fixarea Ca^{2+} la calmodulină determină o tranziţie conformaţională a moleculei, o suprafaţă nepolară este descoperită şi poate interacţiona cu o proteină ţintă. Activitatea acesteia din urmă este alterată de contactul ei cu calmodulina.

Concentraţia celulară a calmodulinei este sufucient de mare pentru ca această proteină să nu devină limitantă pentru procesul dat. Interacţiunile dintre Ca^{2+} şi calmodulină, pe de o parte, şi dintre Ca-calmodulină şi proteina ţintă, pe de alta, sunt uşor reversibile. Când încetează stimularea celulară concentraţia Ca^{2+} scade, calmodulina eliberează ionii Ca^{2+} şi revine la conformaţia anterioară, detaşându-se de pe proteina ţintă. Aceasta din urmă îşi redobândeşte şi ea starea anterioară.

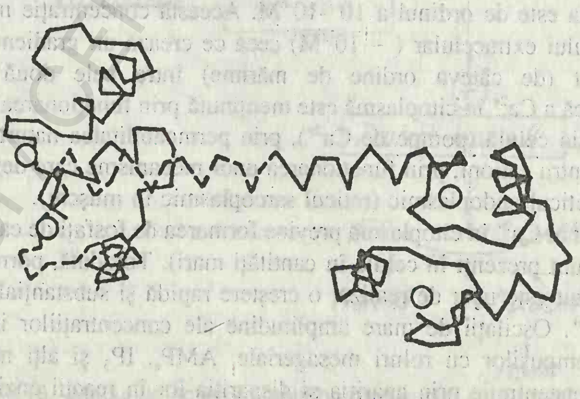


Fig. XII.16 - Structura calmodulinei

Ca - calmodulina reglează o mare diversitate de procese:

- reglează contracţia muşchilor netezi şi a microfilamentelor din celule nemusculare (implicate în molilitatea celulară, mitoză, endocitoză, exocitoză);
- activează pompa de Ca^{2+} din membrana plasmică;
- reglează activitatea unui număr de protein kinaze, ele singure modulatori ai altor enzime;
- interacţionează cu celelalte sisteme mesageriale prin reglarea activităţii adenilat ciclazei, guanilat ciclazei, fosfodiesterazelor.

În unele cazuri calmodulina este o parte componentă a unei enzime oligomerice căreia îi conferă sensibilitate la Ca^{2+}. Astfel în glicogen fosforilazokinază, cu structura cuaternară $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$, subunitatea δ este calmodulină. Activitatea catalitică deplină a enzimei este dobândită prin fixarea ionilor Ca^{2+} la această subunitate.

Troponina C este o proteină înrudită cu calmodulina. Ea este un component al aparatului contractil al muşchilor striaţi. Troponina C împiedică asocierea miozinei cu actină. După legarea Ca^{2+} la troponina C are loc o modificare conformaţională care permite legarea miozinei la actină şi contracţia muşchiului.

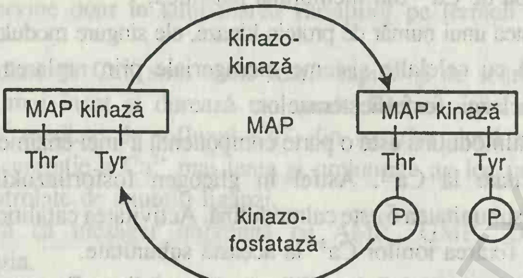
Mecanismul de acţiune a unor hormoni care reglează creşterea şi proliferarea celulară

Insulina şi alţi factori de creştere, IGF-I, EGF, PDGF, FGF, NGF (vezi mai departe) reglează creşterea şi diviziunile celulare. Mecanismele prin care semnalul extern ajunge în nucleu şi care sunt moleculele care au rolul de transductori ai mesajului mitogen sunt încă puţin cunoscute. O deschidere spre înţelegerea acestor procese a fost observaţia că mulţi hormoni care influenţează proliferarea celulelor au receptori membranari care posedă activitate protein kinazică specifică faţă de resturi Tyr. Aşa cum s-a arătat mai sus, receptorii insulinei, al IGF-I (insulin-like growth factor), al EGF (epidermal growth factor) au un domeniu intracelular care dobândeşte activitate protein kinazică tirozin-sepcifică după legarea hormonului. Are loc o autofosforilare a receptorului ceea ce amplifică funcţia sa kinazică. Această funcţie se manifestă şi asupra unor proteine celulare. Deşi au fost identificate diverse proteine fosforilate la resturi Tyr ca răspuns la un semnal mitogen, nu este încă bine înţeles mecanismul şi nivelul la care este alterat aparatul proliferativ celular.

Un factor comun pentru multe semnale mitogene este activarea unei familii de kinaze denumite MAP kinaze (mitogen-activated phosphokinases). Aceste kinaze sunt distincte de kinazele activate de AMP_c, de DAG sau Ca^{2+}. Substratele lor sunt proteine cu diverse roluri, insuficient cunoscute, în diviziunea celulelor.

MAP kinazele funcţionează ca enzime convertibile prin fosforilare - desfosforilare, formele fosfo sunt active, ele reprezintă semnale mitogene pozitive, formele defosforilate

au rolul de semnale mitogene negative. Conversia MAP kinazelor este catalizată de enzime, o MAP kinazokinază şi o MAP kinazofosfatază:



Atât MAP kinazokinaza cât şi MAP kinazofosfataza au specificitate dublă, fosforilează, respectiv, hidrolizează gruparea fosforil de la un rest de treonină şi unul de tirozina situate în secvenţa Thr - Glu - Tyr.

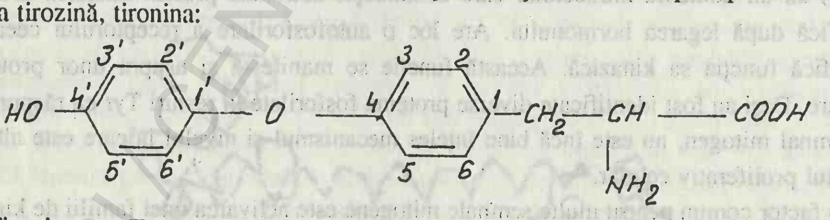
XII.4. HORMONII TIROIDIENI

Glanda tiroidă produce doi hormoni, tetraiodotironina (T4 sau tiroxina) şi triiodotironina (T_3) care reglează procese metabolice fundamentale ale tuturor ţesuturilor şi sunt esenţiali pentru viaţă.

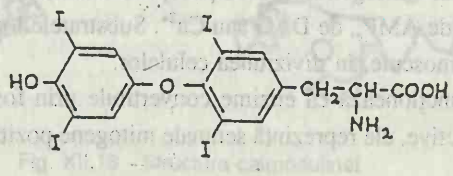
Glanda tiroidă este aşezată în partea anterioară a gâtului, este alcătuită din doi lobi uniţi printr-un istm. La adult cântăreşte aproximativ 20 g.

Unităţile funcţionale ale tiroidei sunt foliculii tiroidieni alcătuiţi dintr-un strat de celule epiteliale care delimitează un miez gelatinos, omogen, denumit coloid. Acest coloid constă dintr-o soluţie concentrată de tireoglobulină. Foliculii tiroidieni au o reţea capilară bogată.

Structură. Hormonii tiroidieni sunt derivaţi ioduraţi ai unui compus ipotetic, derivat de la tirozină, tironina:

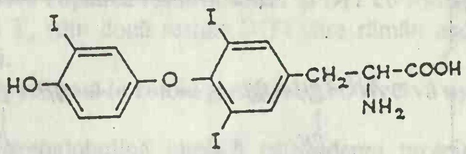


Tiroxina sau T_4 este 3,5,3',5' - tetraiodotironina:



BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

T_3 este 3,5,3' - triiodotironină:



Aceşti hormoni cuprind iod şi funcţia tiroidiană este intim corelată cu metabolismul acestui element.

Biosinteză. Biosinteza hormonilor tiroidieni este un proces complex care se desfăşoară în celulele tiroidiene şi în coloid (de fapt la interfaţa dintre celule şi coloid); implică pe lîngă un aparat enzimatic complex, participarea iodului şi tireoglobulinei ca precursori (Fig. XII.17).

Etapele sintezei de hormoni tiroidieni sunt:

- captarea ionilor de iodură, I^-, din plasmă;
- oxidarea iodului şi iodurarea unor resturi tirozil din tireoglobulină (organificarea iodului);
- cuplarea resturilor de tirozină iodurată şi formarea de T_3 şi T_4 ca părţi componente ale tireoglobulinei;
- endocitoza tireoglobulinei din coloid în celule, hidroliza proteinei, eliberarea de T_3 şi T_4 şi secreţia acestora în sânge.

Iodul pătrunde în organism ca ioni de iodură, prin absorbţie în tractul gastrointestinal, din apă, alimente, impurităţi ale sării de bucătărie. Din plasmă ionii I^- sunt captaţi de tiroidă printr-un proces activ, dependent de ATP (pompa de iod). O cantitate mică de iodură traversează membrana celulară reversibil, prin difuzie. Prin transport activ tiroida este aptă să realizeze o concentrare a iodului care, în deficienţă de iod, poate să fie de 40-50 ori nivelul plasmatic al iodului. Captarea iodului în tiroidă este inhibată de ioni ca perclorat (ClO_4^-), pertehnetat (ThO_4^-), tiocianat (SCN^-), competitori ai iodului pentru mecanismul de transport. Această inhibiţie este utilizată în unele procedee de explorare a funcţiei tiroidiene.

Oxidarea iodului are loc pe suprafaţa apicală a celulelor tiroidiene unde este localizată tireoperoxidaza care catalizează reacţia:

$$I^- + H_2O_2 + 2H^+ \longrightarrow I^+ + 2H_2O$$

Peroxidul de hidrogen se formează intracelular sub acţiunea unei oxidaze NADPH dependente:

$$NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow NADP^+ + H_2O_2$$

Forma oxidată a iodului, probabil I^+, nu este eliberat din centrul activ al enzimei, el este utilizat în continuare la iodurarea tireoglobulinei.

Tireoglobulina este o glicoproteină cu masa de 660 kdaltoni şi un conţinut de glucide de 8-10%. Cuprinde peste 100 resturi tirozil per moleculă. Sinteza sa are loc în celulele tiroidiene şi după glicozilare este secretată în coloid. Tireoglobulina este iodurată, sub acţiunea tireoperoxidazei, la interfaţa dintre celule şi coloid. Prin monoiodurare se formează resturi de monoiodotirozină (MIT) şi prin diiodurare resturi de diiodotirozină (DIT).

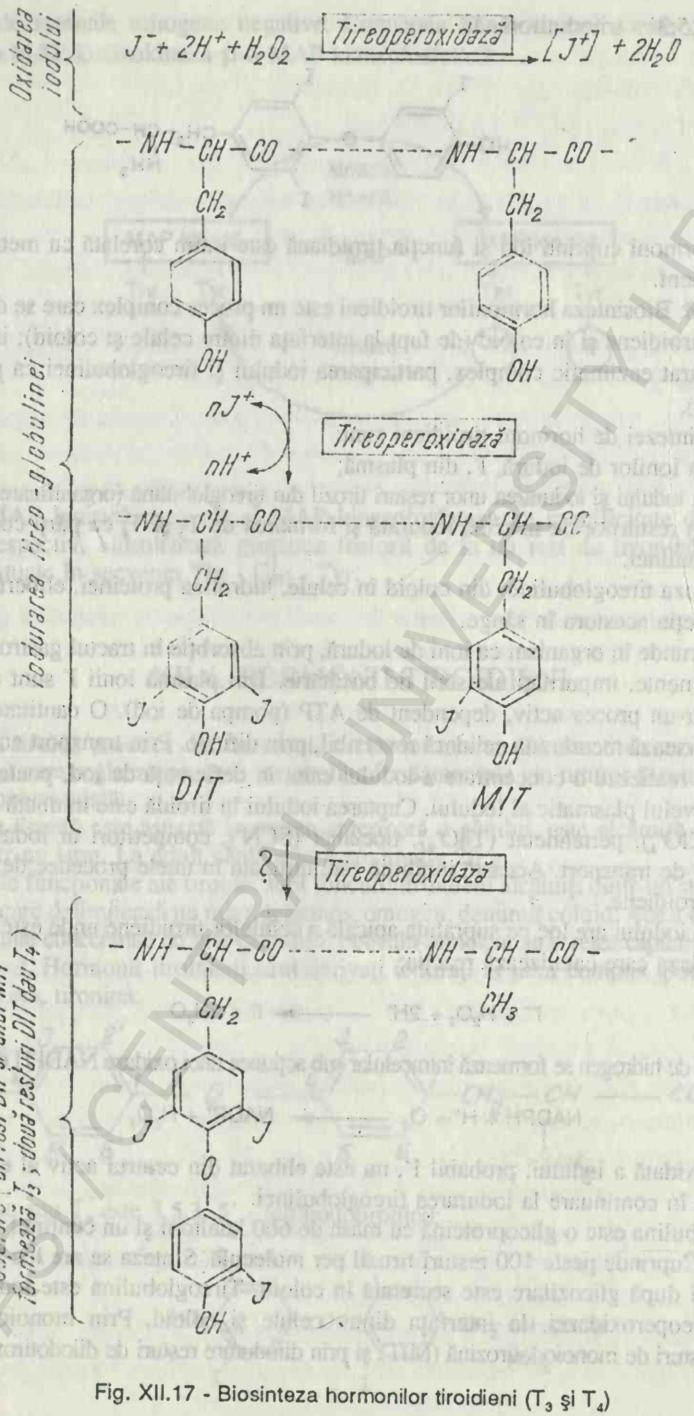


Fig. XII.17 - Biosinteza hormonilor tiroidieni (T_3 şi T_4)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Printr-un proces, al cărui mecanism nu este încă cunoscut, la care participă de asemenea tireoperoxidaza are loc cuplarea resturilor MIT şi DIT cu formare de T_3 (dintr-un rest DIT şi unul MIT) şi T_4 (din două resturi DIT) care rămân ancorate în lanţul polipeptidic al tireoglobulinei.

Tireoglobulina iodurată este păstrată în coloid şi reprezintă o rezervă uşor mobilizabilă de hormoni tiroidieni.

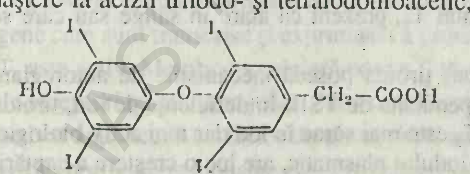
Eliberarea T_3 şi T_4 din tireoglobulină implică pătrunderea proteinei în celulele tiroidiene. Suprafaţa apicală a celulelor înglobează picături de coloid şi prin endocitoză picăturile sunt internalizate. Urmează apoi fuziunea picăturilor de coloid cu lizozomii şi hidroliza tireoglobulinei. Alături de aminoacizi diverşi, care intră în fondul metabolic celular, sunt eliberate T_4, T_3, MIT şi DIT. Hormonii T_3 şi T_4 sunt secretaţi în sânge. MIT şi DIT sunt supuse unui proces de deiodurare (sub acţiunea unei deioduraze NADP-dependentă) şi iodul este recuperat ca I^-. Tiroida secretă în principal T_4 şi mai puţin T_3. T_3 din sânge provine şi prin deiodurarea periferică a T_4. T_3 este de câteva ori mai activ biologic decât T_4. Se consideră că la nivel celular acţionează numai T_3.

Transport. Hormonii tiroidieni, insolubili, circulă în plasmă fixaţi pe două proteine transportoare specifice, TBG (thyroxine binding globulin) şi TBPA (thyroxyne-binding prealbumin) şi de serumalbumină. TBG, glicoproteină cu masa de 50 000 daltoni, este sintetizată în ficat şi cantitatea de TBG este reglată de diverşi factori hormonali. Estrogenii cresc sinteza acestei proteine, androgenii şi glucocorticoizii o scad. TBG leagă aproximativ 70% din hormonii tiroidieni, are afinitate mai mare pentru T_4 decât pentru T_3. Posedă câte un situs de legare per mol. TBPA leagă numai T_4, având afinitate şi capacitate mai mică decât TBG. Serumalbumina, cu afinitate mică dar capacitate mare, transportă aproximativ 10% din T_4 şi 30% din T_3. Activitate biologică prezintă numai hormonii liberi, ceea ce reprezintă 0,04% din totalul T_4 şi 0,4% din totalul T_3.

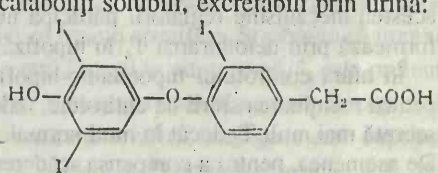
Metabolism. Timpul de înjumătăţire pentru T_4 este de 6-7 zile şi de 1,5 zile pentru T_3. Calea majoră de metabolizare a hormonilor tiroidieni constă în deiodurare progresivă la nivelul ţesuturilor periferice ca rinichi, ficat, muşchi (Fig. XII.18). Prin monodeiodurare T_4 dă naştere la doi compuşi, T_3 cu activitate hormonală mai mare decât T_4 şi rT_3, biologic inactiv. Aproximativ 30-40% din T_4 formează T_3 şi 40% trece în rT_3 . T_3 format prin deiodurare periferică contribuie într-o proporţie de 80-90% la realizarea nivelului plasmatic de T_3 circulant. Distribuţia T_4 spre formare de T_3 sau rT_3 (depinzând de activităţile relative ale 5 şi 5'-monodeiodurazei) constituie un mecanism de reglare a concentraţiei hormonilor tiroidieni circulanţi.

T_3 şi rT_3 sunt în continuare deiodurați la diiodotironine, T_2, şi monoiodotironine, T_1, inactive, epurate rapid din plasmă (Fig. XII.18).

T_4, în proporţie de aproximativ 20% este metabolizată şi pe alte căi. Este conjugată cu acid glucuronic sau cu acid sulfuric şi eliminată prin bilă şi prin urină. Prin transformări ale catenei laterale (transaminare şi decarboxilare oxidativă) T_4 şi T_3 dau naştere la acizii triiodo- şi tetraiodotiroacetic, cataboliţi solubili, excretabili prin urină:



Acid tetraiodotiroacetic



Acid triiodotiroacetic

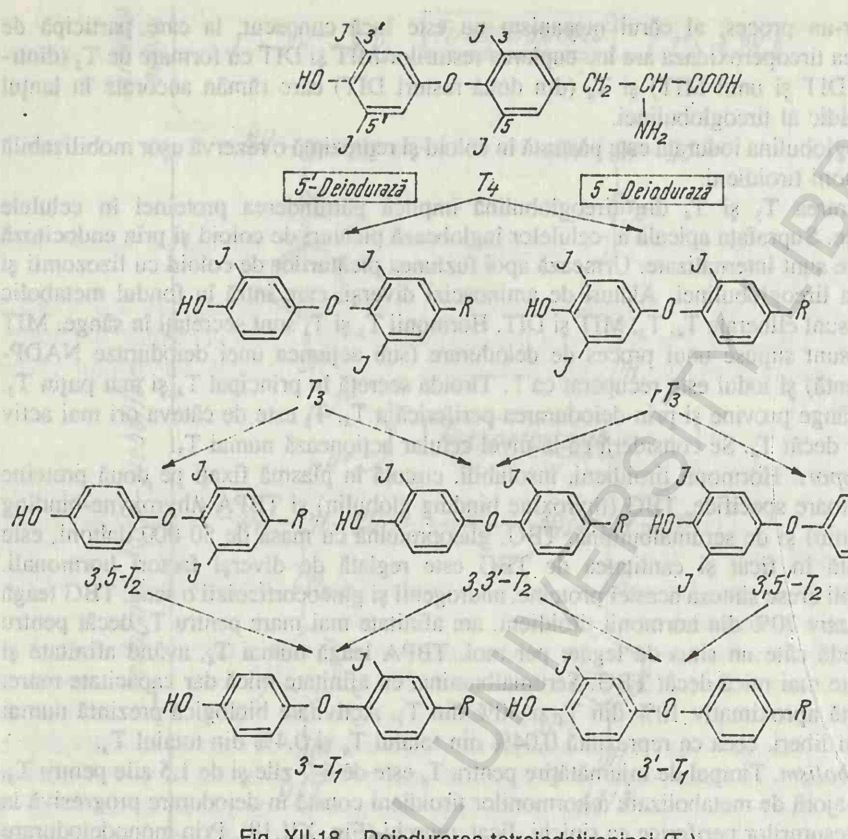


Fig. XII.18 - Deiodurarea tetraiodotironinei (T_4)

Reglare. Sinteza şi secreţia de hormoni tiroidieni se află sub controlul unui sistem feedback negativ la care participă tireotropina hipofizară (TSH), hormonul hipotalamic eliberator de tireotropină (TRH) şi hormonii tiroidieni circulanţi (Fig. XII.19). Sinteza şi secreţia de TRH este controlată de centri nervoşi din creier prin intermediul hormonilor tiroidieni din plasmă. Nivele scăzute de T_3 stimulează formarea de TRH care la rândul său, determină sinteza şi secreţia de TSH. TSH acţionează asupra tiroidei (via AMP_c) activând transportul iodului în tiroidă, organificarea iodului, endocitoza şi hidroliza tireoglobulinei şi secreţia de hormoni în sânge. Creşterea nivelului plasmatic al hormonilor tiroidieni blochează evenimentele de mai înainte, pe de o parte, prin acţiune inhibitorie la nivelul hipotalamusului şi, pe de alta, prin inhibiţia secreţiei de TSH. La acestea mecanisme reglatorii participă numai T_3, prezent ca atare în sânge sau care se formează prin deiodurarea T_4 în hipofiză.

În afara controlului hipotalamo-hipofizar, tiroida posedă mecanisme de autoreglare pentru menţinerea stării de eutiroidie, independente de TSH. În deficienţa de iod, tiroida secretă mai mult T_3 decât în mod normal, T_3 este mai sărac în iod dar mai activ biologic. De asemenea, pentru a compensa scăderea iodului plasmatic, are loc o creştere a captării iodului în tiroidă. În cazul creşterii concentraţiei I^- intratiroidal scade viteza etapelor de organificare a iodului (effect Wolff-Chaikoff).

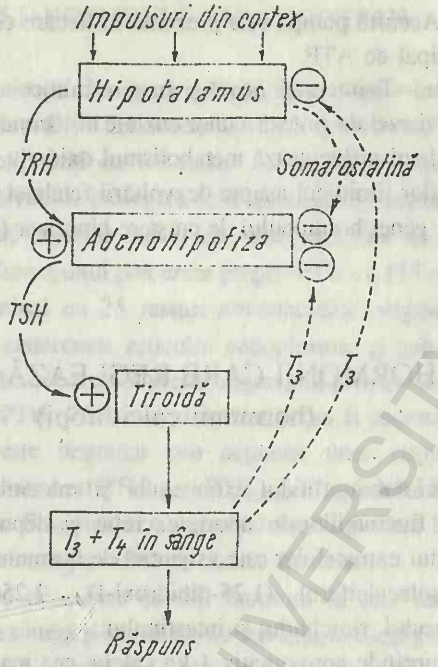


Fig. XII.19 - Reglarea funcţiei tiroidiene.
TSH = tireotropină; TRH = hormonul eliberator de tireotropină;
T_3 = triiodotironină; T_4 = tetraiodotironină

Un alt mecanism reglator al nivelului hormonilor tiroidieni circulanţi este transformarea T_4 în T_3 versus rT_3. În inaniţie este favorizată conversia $T_4 \rightarrow rT_3$ pentru a diminua arderile şi consumul de materiale energogene.

Acţiuni biologice. Funcţia metabolică generală a hormonilor tiroidieni este aceea de a controla metabolismul oxidativ, procesele de ardere, prin care se obţin energie metabolică (ATP) şi căldură (acţiune calorigenă). Sub acţiunea hormonilor tiroidieni, creşte viteza metabolismului bazal, diminuează rezervele energetice lipidice sau glucidice, catabolismul proteic este intensficat (bilanţul azotat se negativează).

Totodată, hormonii tiroidieni joacă roluri esenţiale în dezvoltarea fetală şi postnatală, în particular asupra sistemului nervos şi scheletic.

La nivel celular, hormonii tiroidieni ca şi cei steroidici, acţionează prin activarea unor gene care sunt transcrise şi exprimate ca proteine cu funcţii specifice. Se admite că numai T_3 este activ. Membrana celulară pare a fi traversată liber şi în citoplasmă T_3 este preluat de receptori cu afinitate joasă, după care hormonul trece pe receptorul nuclear. Receptorul activat acţionează ca factor de transcriere, activează transcrierea unor gene care cuprind HRE (hormone responsive element) specifice. Se consideră că acţiunea primară a T_3, de reglare a metabolismului oxidativ, este rezultatul creşterii sintezei de Na^+/K^+ - ATPază

BOOKS UNIVERSITY LIBRARY

(pompa de sodiu). Această pompă este prezentă în fiecare celulă şi funcţionarea sa este consumatorul principal de ATP.

Complexul receptor-T_3 interacţionează şi cu gene mitocondriale stimulând transcrierea acestora. Creşterea vitezei de sinteză a unor enzime mitocondriale poate fi o altă cale prin care hormonii tiroidieni influenţează metabolismul oxidativ celular.

Efectele hormonilor tiroidieni asupra dezvoltării fetale şi postnatale par a fi datorate, activării transcrierii genei hormonului de creştere hipofizar (GH) şi a genei NGF (nerve growth factor).

XII.5. HORMONII CARE REGLEAZĂ CALCEMIA
(hormonii calciotropi)

Concentraţia calciului în fluidul extracelular şi calcemia sunt menţinute la valori constante în ciuda fluctuaţiilor în aport, excreţie şi depozitare a calciului în oase. Homeostazia calciului extracelular este asigurată de hormonul paratiroidian, calcitonină şi 1,25-dihidroxi-colecalciferol (1,25-dihidroxi-D_3, $1,25(OH)_2D_3$, calcitriol) care acţionează asupra osului, rinichiului şi intestinului.

Corpul omului cuprinde aproximativ 1 kg calciu, cea mai mare parte (99%) în oase şi dinţi sub formă de hidroxiapatită insolubilă. O fracţiune a calciului din os (1-2%) se află în fluidul periosteal şi pe suprafaţa osului şi participă la schimbul cu calciul extracelular. Calciul din oase, pe lângă rolul structural, reprezintă o sursă de calciu pentru asigurarea homeostaziei extracelulare.

Calcemia este cuprinsă între 9 şi 11 mg/dl (2,25-2,75 mmoli/l) şi calciul plasmatic este alcătuit din trei fracţiuni:

- Ca^{2+} complexat de anioni cu moleculă mică, ca citrat, fosfat, reprezintă aproximativ 6% din total;
- Ca^{2+} complexat de proteine, în special de serumalbulină;
- Ca^{2+} liber, calciu ionizat, care reprezintă aproximativ jumătate din total.

Calciul ionizat reprezintă forma activă a calciului şi concentraţia sa este foarte fin controlată, cu variaţi interindividuale foarte mici (1,1-1,3 mmoli/l).

Calciul intracelular reprezintă numai o mică fracţiune (10^{-7}-10^{-6}M) din calciul total. Concentraţia calciului intracelular, citosolic este de 1000-10000 ori mai mică decât a calciului extracelular (10^{-3}M) şi este menţinută la un nivel foarte scăzut prin impermeabilitatea membranei plasmatice pentru calciu şi prin funcţionarea unor mecanisme active şi foarte eficiente de scoatere a calciului din celule (pompe de calciu). În mitocondrii şi reticul endoplasmic este sechestrată o cantitate de calciu care poate fi mobilizată la cerere. Multe procese intracelulare sunt mediate de fluctuaţii ample şi rapide ale calciului intracelular prin influx de calciu extracelular sau prin eliberarea sa din depozitele intracelulare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XII.5.1. HORMONUL PARATIROIDIAN

Glandele paratiroide, alcătuite din două perechi, sunt situate în partea anterioară a gâtului, în spatele capsulei tiroidiene. Elaborează şi secretă hormonul paratiroidian, PTH.

Structură. PTH este polipeptid cu 84 resturi amioacidice. Diferenţele structurale interspecii sunt reduse. Activitatea biologică este localizată în segmentul 1-34.

Biosinteză. PTH ca orice proteină secretorie, este sintetizat în ribozomi ataşaţi pe reticulul endoplasmic, sub forma unui precursor prepro-PTH cu 115 resturi aminoacidice. Segmentul peptidic N-terminal cu 25 resturi aminoacidice, segment pre- sau peptid semnal, este îndepărtat în cisterenele reticului endoplasmic şi sub formă de pro-PTH pătrunde în aparatul Golgi. La acest nivel pierde segmentul pro, un hexapeptid N-terminal şi devine hormonul activ, PTH. PTH nou sintetizat poate fi secretat imediat, stocat în granule de depozit sau este degradat sub acţiunea unor peptidaze intracelulare. Principalele fragmente rezultate sunt PTH_{1-36} şi PTH_{37-84}. Fragmentul N-terminal este rapid degradat la di- şi tripeptide. Fragmentul C-terminal este depozitat în granule împreună cu PTH şi este eliberat în circulaţie odată cu acesta din urmă.

Controlul secreţiei. Spre deosebire de alţi hormoni la care cantitatea de hormon circulant depinde de viteza de sinteză şi/sau de ritmul secreţiei, în cazul glandelor paratiroidiene cantitatea de PTH este reglată la nivelul degradării intraglandulare. Pre-pro-PTH, pro-PTH şi PTH sunt sintetizaţi continuu şi într-un ritm constant, independent de fluctuaţiile calciului extracelular. Cantitatea de PTH din glandă depinde de viteza degradării sale, ea fiind dependentă de calcemie. Creşterea calcemiei accelerează degradarea, şi o scădere a calcemiei diminuează degradarea PTH, mai mult hormon fiind disponibil pentru secreţie. Eliberarea hormonului este stimulată, de asemenea, de scăderea calcemiei.

Metabolism. Timpul de înjumătăţire al PTH circulant este scurt. Degradarea sa are loc în ţesuturi periferice, în special în ficat, prin reacţii analoage cu acelea care au loc în paratiroidă. Fragmentele peptidice rezultate (fragment N-terminal şi C-terminal) trec în sistemul circulator şi se adaugă acelora eliberate din paratiroide. Fragmentele N-terminale, cu activitate biologică, au $t_{1/2}$ de 10 minute; fragmentele C-terminale au vieţi mai lungi ($t_{1/2}$ de 20-40 minute).

Acţiune. Parathormonul are acţiune hipercalcemiantă, se opune tendinţei de scădere a calcemiei, prin creşterea eliberării calciului din oase, scăderea excreţiei renale şi promovarea absorbţiei intestinale a calciului (acţiune indirectă). Celulele ţintă ale acestor organe funcţionează ca bariere celulare între compartimentul fluid extracelular şi lumenul tubular renal şi intestinal şi compartimentul fluid al osului.

Receptorul pentru PTH este situat în membrana plasmică a celulelor ţintă şi interacţiunea receptorului cu hormonul are ca rezultat creşterea concentraţiei AMP_c. Nu se cunosc însă factorii direct implicaţi în exprimarea efectelor PTH.

În os, PTH acţionează asupra diferenţierii şi activităţii diverselor tipuri de celule (osteoblaşti, osteoclaşti, osteocite) având ca rezultat resorpţia osului, degradarea matricei organice şi solubilizarea substanţei minerale, cu eliberarea în fluidul extracelular a ionilor Ca^{2+} şi fosfat.

La nivel renal, PTH creşte reabsorbţia calciului până aproape de 100% şi inhibă reabsorbţia ionilor fosfat (acţiune fosfaturică). Efectele osoase şi renale cresc calcemia, fără o creştere echivalentă a concentraţiei fosfatului, împiedicându-se astfel atingerea unor concentraţii critice la care aceşti ioni să formeze fosfat tricalcic insolubil.

Efectul hipercalcemiant al PTH prin intervenţie renală este foarte rapid. Răspunsul osos este mai lent dar de o amploare mult mai mare. Efectele osoase ale PTH sunt independente de cele asupra rinichiului. Acţiunea resorptivă osoasă se manifestă şi la animale nefrectomizate sau în celule osoase în culturi.

PTH promovează absorbţia calciului din intenstin printr-un mecanism indirect. Activează 1 α - hidroxilaza renală, enzimă care transformă 25-hidroxi-D_3 inactiv în 1,25 - dihidroxi-D_3, metabolitul activ al vitaminei D_3.

XII.5.2. CALCITONINA

Calcitonina este produsă de celulele C adiacente celulelor foliculare ale tiroidei. Este un polipeptid cu 32 resturi aminoacidice şi masa de 3700 daltoni. Cuprinde o punte disulfurică între primul şi al şaptelea rest aminoacidic (Fig. XII.20).

Calcitonina are efecte opuse cu ale PTH, se opune creşterii concentraţiei calciului şi fosfatului în plasmă. Acţionează asupra osului inhibând resorpţia osoasă. De asemenea, favorizează translocarea fosfatului din lichidul extracelular în fluidul periosteal şi în celule osoase.

Efectul hipocalcemiant al calcitoninei este foarte rapid şi tranzitoriu.

Deficienţa sau excesul de calcitonină la om nu produc tulburări ale metabolismului calciului, in opoziţie cu efectele dramatice ale hipo- sau hiperparatiroidismului.

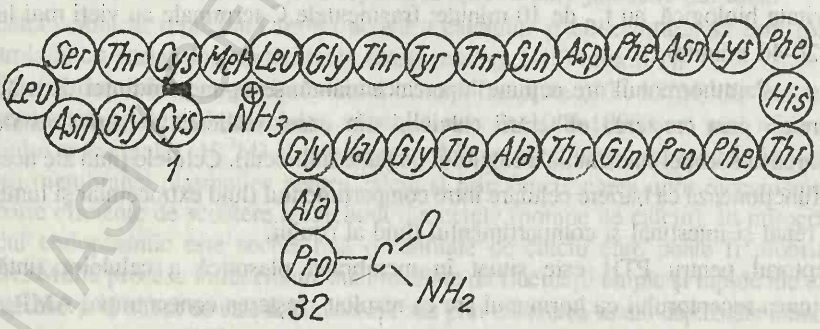
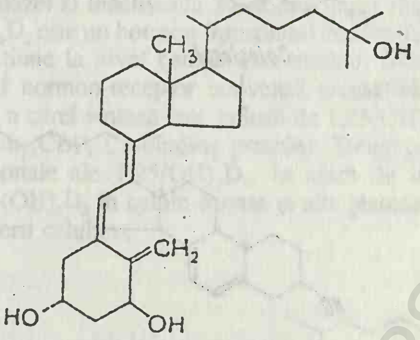


Fig. XII.20 - Structura calcitoninei

XII.5.3. 1,25 DIHIDROXICOLECALCIFEROL (CALCITRIOL)
(1,25-Dihidroxi-D_3; 1,25 $(OH)_2$-D_3)

Acest hormon este un derivat al vitaminei D_3 (colecalciferol):



(1,25-Dihidroxi-D_3; 1,25 $(OH)_2$-D_3)

Vitamina D_3 este sintetizată în organism din colesterol şi aportul exogen este necesar numai în cazul unei insuficiente expuneri la lumină. Precursorul imediat al vitaminei D_3, denumit provitamina D_3, este 7-dehidrocolesterolul (Fig. XII.21). Transformarea 7-dehidrocolesterol → vitamină D_3 este o reacţie de fotoliză ce are loc numai în stratul malpighian al epidermei sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete. Cantitatea de vitamină D_3 sintetizată în organism depinde de gradul de expunere la lumină.

Vitamina D_3 cuprinsă în alimente, fiind liposolubilă este dizolvată în grăsimi şi este absorbită împreună cu lipidele.

Vitamina D_3 de la nivelul pielii şi al intestinului este transportată la ficat de o proteină specifică, DBP (B-binding protein). În ficat suferă o hidroxilare în poziţia 25 şi dă naştere la 25-hidroxi-D_3 (25(OH)D_3). Acest metabolit trece din nou în circulaţie, este transportat de DBP la rinichi. La nivelul tubilor contorţi proximali, D_3 suferă o nouă hidroxilare (sub acţiunea 1α - hidroxilazei) şi se formează 1α, 25 - dihidroxi-D_3 (1,25$(OH)_2D_3$) hormonul activ. Hidroxilarea în poziţia 1α este etapa limitantă de viteză şi activitatea 1α -hidroxilazei controlează cantitatea de hormon sintetizat.

În plasmă hormonul 1,25$(OH)_2D_3$ circulă legat de aceeaşi proteină DBP.

Metabolism. 1,25 $(OH)_2D_3$ are o viaţă foarte scurtă. Este inactivată în rinichi prin hidroxilări suplimentare în poziţiile 23, 24, 26 la metaboliţi inactivi. Calea de eliminare este bila.

Controlul sintezei calcitriolului se exercită în etapa trecerii 25 (OH)D_3 în 1,25$(OH)_2D_3$ sub acţiunea 1α -hidroxilazei. Prin mecanism feedback produsul final inhibă propria sa formare. PTH direct sau prin acţiunea sa hipofosfatemiantă stimulează activitatea 1α -hidroxilazei şi sinteza de calcitriol.

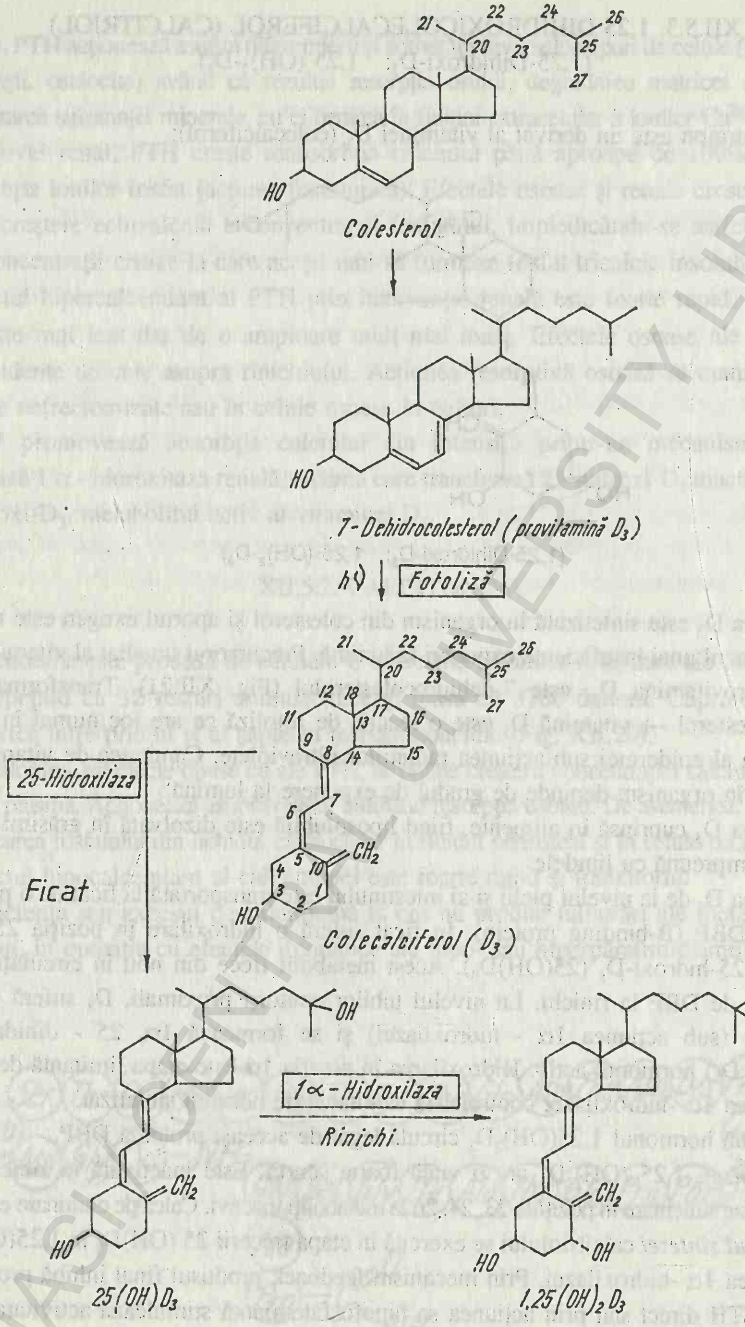


Fig. XII.21 - Biosinteza calcitriolului
(1,25-dihidroxi-colecalciferol, 1,25-$(OH)_2$-D_3)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un alt mecanism de reglare a sintezei de calcitirol se realizează prin scăderea activităţii 24 -hidroxilazei de către PTH. Când activitatea enzimei este mare intră în competiţie cu 1α -hidroxilaza şi transformă 25 (OH) D_3 în 24, 25 $(OH)_2D_3$, metabolit inactiv. Scăderea activităţii 24-hidroxilazei va facilita intervenţia 1α -hidroxilazei şi sinteza hormonului. Creşterea concentraţiei de PTH favorizează sinteza de calcitriol prin activarea 1α -hidroxilazei şi inactivarea 24 -hidroxilazei (Fig. XII.22).

Acţiuni. 1,25$(OH)_2D_3$ este un hormon liposolubil cu o structură înrudită cu a steroizilor şi mecanismul de acţiune la nivel celular este similar. Interacţionează cu un receptor nuclear şi complexul hormon-receptor activează cromatina şi transcrierea unor gene specifice. O proteină a cărei sinteză este indusă de 1,25$(OH)_2D_3$ este proteina de legare a calciului din intestin (CBP, Ca-binding protein). Totuşi această proteină nu exprimă toate acţiunile hormonale ale 1,25$(OH)_2D_3$. În afară de intestin, au fost identificaţi receptori pentru 1,25$(OH)_2D_3$ în celule osoase şi alte ţesuturi. Hormonul ar interveni în promovarea diferenţierii celulare.

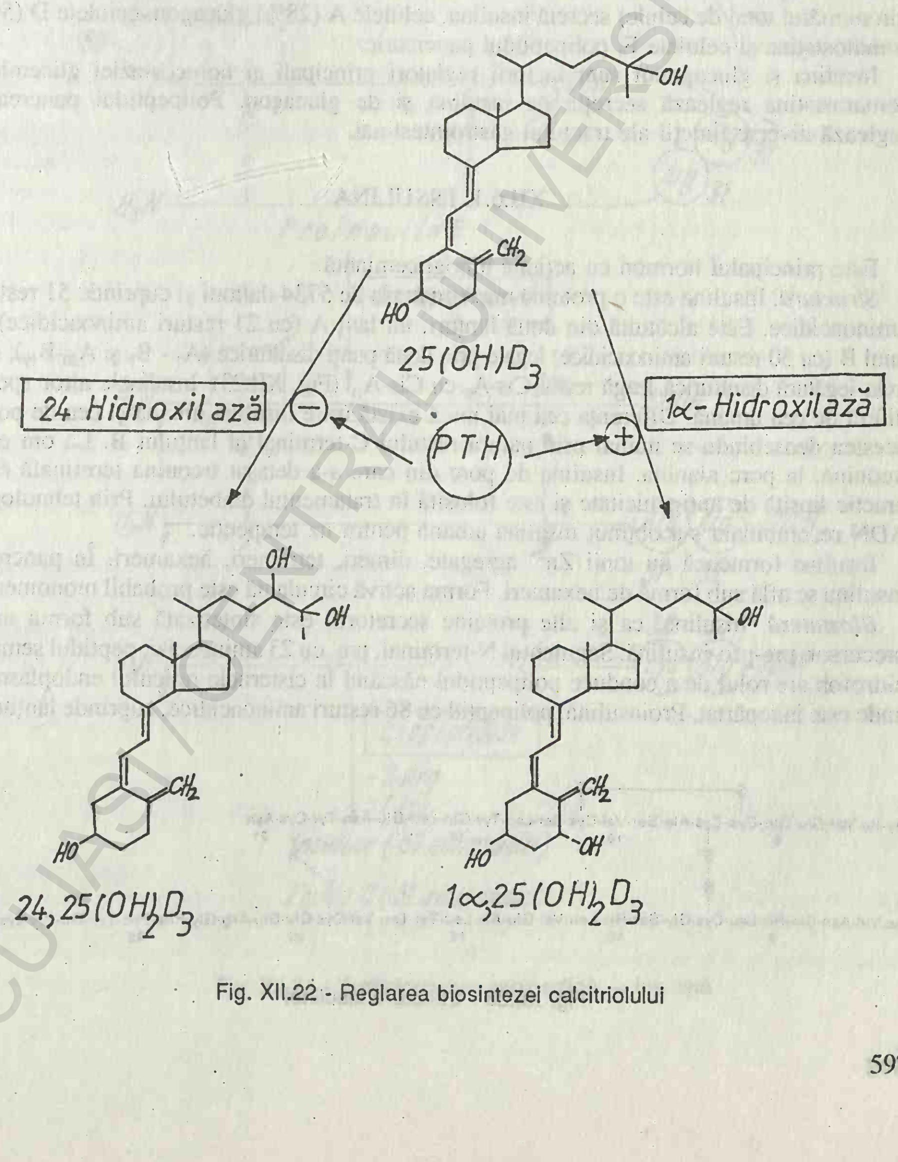


Fig. XII.22 - Reglarea biosintezei calcitriolului

Ţesutul ţintă de predilecţie al $1,25(OH)_2D_3$ este intestinul unde promovează absorbţia calciului şi a fosfatului, transcolarea lor din lumen în spaţiul extracelular. Acest proces are loc în trei timpi; (1) traversarea marginii în perie şi a membranei microvilare; (2) transportul prin celule; (3) traversarea membranei bazale şi intrarea în fluidul extracelular. Nu este încă stabilit în ce etapă şi prin ce mecanism intervine calcitriolul. Inducţia sintezei de CBP nu poate explica singură creşterea absorbţiei de calciu şi fosfat prin peretele intestinal.

XII.6. HORMONII PANCREATICI

Activitatea endocrină a pancreasului este localizată la nivelul insulelor Langerhans. Diversele tipuri de celule insulare, A, B, D, F, secretă fiecare un hormon. Celulel B (70% din numărul total de celule) secretă insulina, celulele A (28%) glucagon, celulele D (5%) somatostatina şi celulele F, polipeptidul pancreatic.

Insulina şi glucagonul sunt factorii reglatori principali ai homeostaziei glicemice, somatostatina reglează secreţia de insulină şi de glucagon. Polipeptidul pancreatic reglează diverse funcţii ale tractului gastrointestinal.

XII.6.1. INSULINA

Este principalul hormon cu acţiune hipoglicemiantă.

Structură. Insulina este o proteină mică cu masa de 5734 daltoni şi cuprinde 51 resturi aminoacidice. Este alcătuită din două lanţuri, un lanţ A (cu 21 resturi aminoacidice) şi unul B (cu 30 resturi aminoacidice) legate prin două punţi disulfurice (A_7 - B_7 şi A_{20}-B_{19}); o a treia legătură disulfurică leagă restul Cis-A_6 cu Cis-A_{11} (Fig. XII.23). Insulinele altor specii diferă de cea umană. Diferenţa cea mai mică există între insulina umană şi cea de porc, acestea deosebindu-se numai prin natura restului C-terminal al lanţului B. La om este treonina, la porc alanina. Insulina de porc din care s-a detaşat treonina terminală este practic lipsită de antigenicitate şi este folosită în tratamentul diabetului. Prin tehnologia ADN recombinant s-a obţinut insulina umană pentru uz terapeutic.

Insulina formează cu ionii Zn^{2+} agregate, dimeri, tetrameri, hexameri. În pancreas insulina se află sub formă de hexameri. Forma activă circulantă este probabil monomerul.

Biosinteză. Insulina, ca şi alte proteine secretorii, este sintetizată sub forma unui precursor, pre-pro-insulină. Segmentul N-terminal, pre, cu 23 aminoacizi, peptidul semnal hidrofob are rolul de a conduce polipeptidul născând în cisternele reticului endoplasmic unde este îndepărtat. Proinsulina, polipeptid cu 86 resturi aminoacidice, cuprinde lanţurile

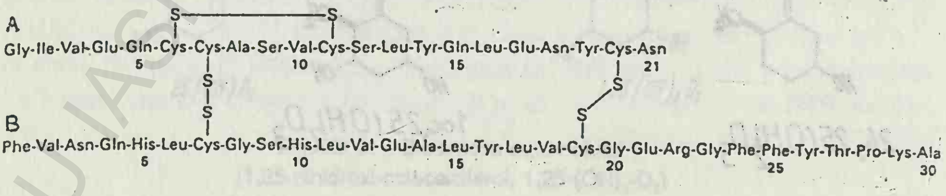


Fig. XII.23 - Structura insulinei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A şi B ale moleculei virtuale de insulină legate prin punţi disulfurice.

Capătul N-terminal al lanţului A este legat de capătul C-terminal al lanţului B prin intermediul unui peptid de legătură.

Proinsulina este transportată din reticulul endoplasmic în aparatul Golgi unde este transformată în insulină. Prelucrarea proinsulinei are loc sub acţiunea unei endopeptidaze care rupe două legături peptidice flancate de resturi aminoacidice bazice. Rezultă trei fragmente asupra cărora acţionează o carboxipeptidază care detaşează resturile de arginină şi lizină de la capătul C-terminal al lanţului B (din insulină) şi al peptidului de legătură (Fig. XII.24). Complexitatea structurală a proinsulinei este necesară stabilirii corecte a punţilor disulfurice din insulină. Lanţurile A şi B separate nu se pot organiza spontan în molecula activă a insulinei.

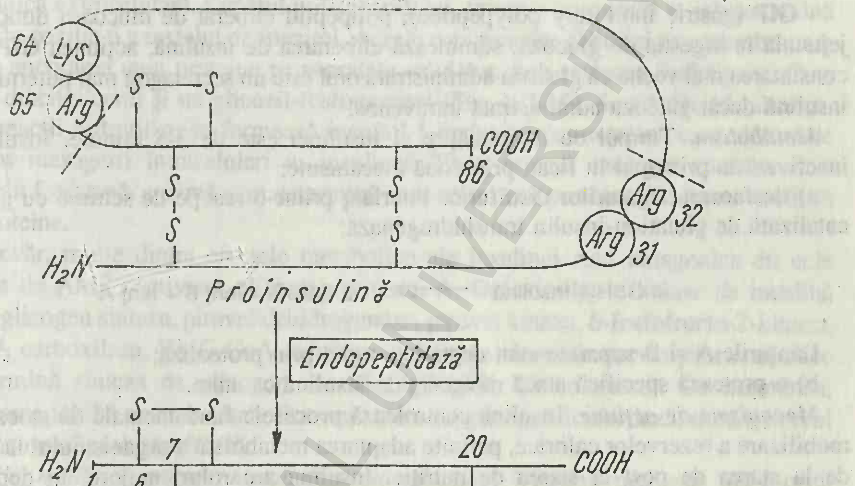


Fig. XII.24 - Transformarea proinsulină → insulină

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Insulina, peptidul C şi o cantitate mică de proinsulină sunt încorporate în granule secretorii şi sunt eliberate împreună în circulaţie.

Reglarea secreţiei. Glicemia este factorul reglator principal al secreţiei de insulină. Glicemia à jeun (80-100 mg/dl) este suficientă pentru a declanşa secreţia de insulină. Eliberarea insulinei creşte odată cu glicemia, răspunsul maxim obţinându-se la 300-500 mg/dl.

În afară de glucoză mulţi alţi factori influenţează secreţia de insulină:

- alte monozaharide uşor metabolizabile ca fructoza, manoza au efect stimulator;
- aminoacizii, în special arginina, lizina şi leucina, stimulează puternic secreţia de insulină;
- agoniştii α - adrenergici inhibă secreţia de insulină; adrenalina prin α - recepţie este un inhibitor fiziologic al secreţiei de insulină;
- somatostatina, produsă de celulele D din pancreas, prin acţiune paracrină, inhibă secreţia de insulină;
- GIP (gastric inhibitory polypeptide), polipeptid eliberat de mucoasa duodenală şi jejunală la ingestia de glucoză, stimulează eliberarea de insulină; acţiunea GIP explică constatarea mai veche că glucoza administrată oral este un secretagog mai puternic pentru insulină decât glucoza administrată intravenos.

Metabolism. Timpul de înjumătăţire al insulinei este de 3-5 minute. Insulina este inactivată în principal în ficat, prin două mecanisme:

a) desfacerea legăturilor disulfurice interlanţ printr-o reacţie de schimb cu glutation, catalizată de glutation-insulin transhidrogenază:

$$4\ GSH + \text{insulină} \longrightarrow 2\ GSSG + \text{lanţ B} + \text{lanţ A}$$

Lanţurile A şi B separate sunt degradate rapid prin proteoliză;

b) o protează specifică atacă molecula de insulină ca atare.

Mecanisme de acţiune. Insulina controlează procesele fundamentale de stocare şi de mobilizare a rezervelor calorice, permite adaptarea metabolică a organismului la trecerea de la starea de post la starea de nutriţie. Insulina are roluri majore, în deosebi, la animalele care se hrănesc intermitent, este mai puţin importantă pentru animalele care primesc hrana continuu (ierbivore). Insulina este hormonul care domină faza anabolică a metabolismului. În perioadele de alimentare favorizează depozitarea excesului caloric sub formă de lipide, glicogen, proteine.

În afară de roluri metabolice insulina exercită acţiuni mitogene specifice factorilor de creştere, influenţează creşterea fetală, diferenţierile celulare, regenerarea ţesuturilor.

Nu există ţesuturi ţintă specifice pentru insulină. Toate ţesuturile cuprind receptorul insulinic (5.000 - 20.000 receptori per celulă) şi sunt apte să răspundă la mesajele transportate de acest hormon.

Structura receptorului insulinic a fost descrisă mai sus. El aparţine familiei de receptori cu activitate protein kinazică specifică pentru tirozină.

Varietatea foarte mare a efectelor celulare produse de insulină, distribuţia ubicuitară a receptorilor săi, nu permit o explicaţie unitară a tuturor acestor acţiuni. Se admit mai multe modele privind mecanismul de acţiune a insulinei:

a) Activitatea protein kinazică a receptorului activat, prin fosforilarea unei proteine, iniţiază o cascadă de fosforilări şi defosforilări care alterează activităţile sau/şi determină inducţia (represia) sintezei unor proteine reglatoare. Aceste proteine exprimă efectele celulare specifice ale insulinei.

BCU Cluj / Central University Library

b) Insulina determină prin exocitoză - endocitoză redistribuirea unor proteine între membrana plasmică şi citoplasmă. Astfel de redistribuire suferă proteina transportoare pentru glucoză, pentru aminoacizi, receptorul pentru LDL (lipoproteine cu densitate mică), transferina. Aceste proteine facilitează transportul substanţelor nutritive în celule, permit depozitarea substanţelor excedentare ca glicogen, lipide, proteine.

c) Insulina determină activarea unui sistem efector intracelular şi formarea de mesageri secunzi. Mai mulţi compuşi au fost incriminaţi ca mesageri intracelulari ai insulinei. O ipoteză susţinută de date experimentale din ce în ce mai numeroase atestă ideia activării, printr-un mecanism încă neelucidat (independent de o proteină G), a unei fosfolipaze de tip C. Substratul acestei enzime este un glicozil-fosfatidil-inozitol. Aceşti componenţi membranari cuprind o unitate fosfatidil-inozitol inserată în membrană şi o unitate polizaharidică extracelulară. Capătul polizaharidului, printr-o unitate de α -glucozamină este legat la poziţia 6 a restului de inozitol. Aceste componente glicolipidice membranare servesc la ancorarea unor proteine pe suprafaţa celulelor. Sub acţiunea fosfolipazei C se formează diacilglicerol şi un glicozil-fosfoinozitol (Fig. XII.25). Se admite că, ulterior, prin alte reacţii hidrolitice se formează inozitol-1-fosfat şi glucozamină care alături de DAG sunt mesagerii intracelulari ai insulinei. Ţinta acestor mesageri pare a fi o fosfoprotein fosfatază, enzimă care determină conversia unor proteine din forme fosfo în defosfoproteine.

Într-adevăr, multe dintre efectele metabolice ale insulinei sunt antagonice cu cele promovate de AMP_c, activator al protein kinazei A. Defosforilările induse de insulină activează glicogen sintaza, piruvat dehidrogenaza, piruvat kinaza, 6-fosfofructo-2-kinaza, acetil-CoA carboxilaza, HMG-CoA reductaza, enzimele cheie ale secvenţelor anabolice care determină sinteza de glicogen, de triacilgliceroli, de colesterol. De asemenea, defosforilarea inhibă enzime catabolice reglatoare ca glicogen fosforilază, triacilglicerol lipază, fructozo-2, 6-bisfosfatază.

Acţiunile insulinei asupra metabolismului glucidic. Insulina mediază transportul transmembranar de glucoză în adipocite, tesut muscular şi alte tipuri de celule. Acest efect este realizat prin redistribuirea proteinei transportoare de glucoză din vezicule intracelulare pe suprafaţa celulelor.

Insulina, indirect, favorizează influxul de glucoză în hepatocite. În aceste celule transportorul pentru glucoză funcţionează ca o poartă dependentă numai de gradientul de concentraţie a glucozei între spaţiul extracelular şi interiorul celulei. În hepatocite, insulina induce sinteza de glucokinază. Fosforilarea rapidă a glucozei intracelular determină influxul de glucoză în ficat.

Insulina favorizează toate căile de utilizare a glucozei în muşchi, ficat, ţesut adipos. În ficat, glucoza este depozitată ca glicogen şi este convertită în acizi graşi. Aceştia din urmă încorporaţi în triacilgliceroli sunt exportaţi ca VLDL (lipoproteine cu densitate foarte mică). În muşchii scheletici, glucoza este utilizată ca substrat energogen şi excesul este păstrat ca glicogen. În tesutul adipos, glucoza este utilizată mai ales pentru a furniza glicerolfosfat, metabolitul de la care se sintetizează triacilglicerolii. În ficat, insulina exercită o puternică acţiune antigluconeogenetică prin represia enzimei determinante de viteză, fosfoenolpiruvat carboxikinază.

Acţiunile cumulate ale insulinei asupra metabolismului glucidic au ca rezultat *scăderea glicemiei.*

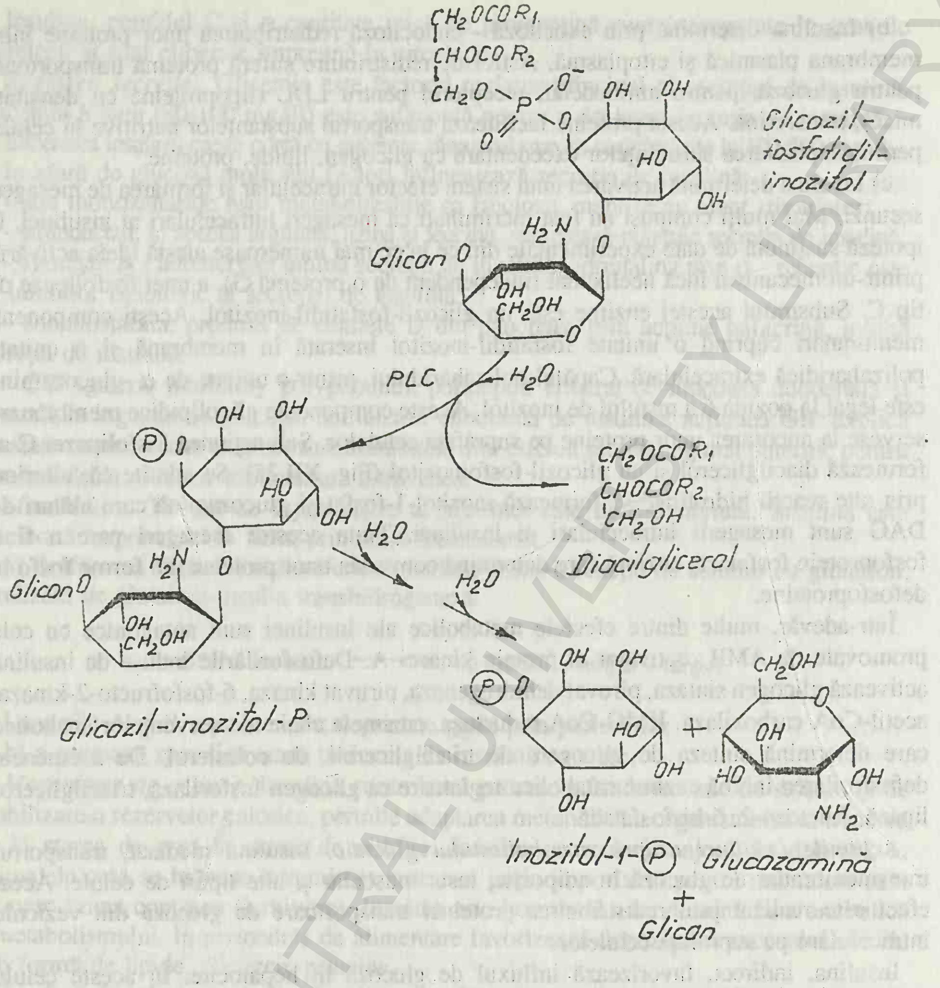


Fig. XII.25 - Mecanismul de acţiune a insulinei prin mediatori intracelulari rezultaţi prin hidroliza unor glicolipide membranare

Acţiunile insulinei asupra metabolismului lipidic pot fi descrise global ca acţiuni antilipolitice şi lipogenetice. Insulina influenţează metabolismul lipidic prin acţiunile directe asupra adipocitelor dar şi prin efectele sale asupra ficatului. La nivelul ţesutului adipos, insulina facilitează influxul de glucoză, transformarea glucozei în glicerolfosfat, activarea lipoproteinlipazei. Aceasta din urmă hidrolizează triacilglicerolii transportaţi ca VLDL sau chilomicroni. Acizii graşi rezultaţi sunt depozitaţi ca triacilgliceroli. De asemenea, insulina inhibă triacilglicerol lipaza din ţesutul adipos (lipaza hormon-sensibilă) diminuând efluxul de acizi graşi din adipocite cu scăderea nivelului de acizi graşi liberi (neesterificaţi) din plasmă. Insulina are acţiune anticetogenică. scade producţia de corpi cetonici (acid acetoacetic şi acid β-hidroxibutiric).

BOOKS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acţiunile insulinei asupra metabolismului aminoacizilor şi al proteinelor. Insulina facilitează transportul aminoacizilor cu R neutru în muşchi, stimulează sinteza proteică şi încetineşte degradarea proteinelor. În afara acestor roluri generale, insulina influenţează sinteza unor proteine specifice intervenind la nivelul transcrierii genelor. Multe din acţiunile hormonale ale insulinei au la bază inducţia sau represia sintezei unor proteine specifice, ca glucokinaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza.

Rolurile insulinei ca factor de creştere. Prin studii pe culturi de celule, in vitro, s-a stabilit că insulina stimulează proliferarea unor tipuri celulare, acţionând ca factor de creştere. Insulina însăşi şi receptorul insulinic prezintă analogie structurală cu IGF (IGF-I şi IGF-II, insuline-like growth factors). Receptorul insulinic activat posedă activitate protein kinazică, însuşire întâlnită şi la receptorii altor factori mitogeni.

XII.6.2. GLUCAGONUL

Hormon pancreatic sintetizat în celulele A (α), din insulele Langerhans, are acţiune antagonică insulinei. Este un agent hiperglicemiant.

Structură, secreţie, metabolism. Glucagonul este un polipeptid cu 29 resturi aminoacidice (Fig. XII.26). Este sintetizat sub forma unui precursor pre-pro-glucagon. Segmentul N-terminal pre (peptid semnal) este detaşat în reticulul endoplasmic. Proglucagonul este prelucrat în aparatul Golgi cu formarea mai multor fragmente polipeptidice. În plasmă, alături de glucagon circulă şi aceste fragmente inactive.

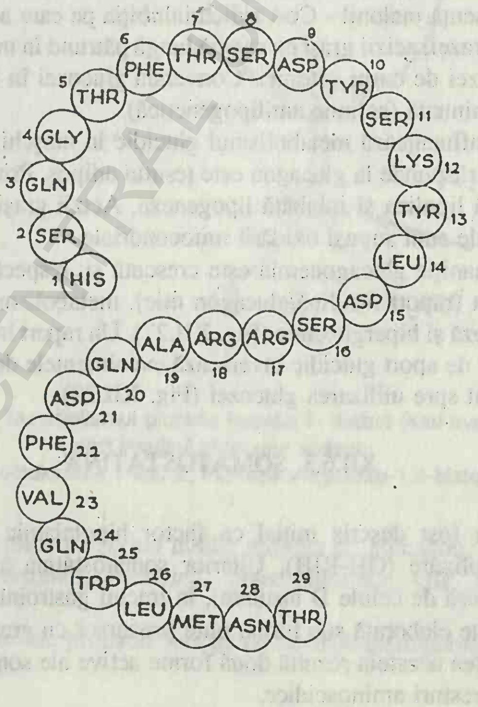


Fig. XII.26 - Structura glucagonului

Glucagonul are $t_{1/2}$ de aproximativ 5 minute. Este degradat rapid în ficat prin detaşarea a două resturi aminoacidice de la capătul N-terminal. Glucagonul este secretat în sângele portal şi la o singură trecere prin ficat o fracţiune importantă este inactivată. Acţiunile reglatorii majore ale glucagonului se manifestă la nivel hepatic.

Reglarea secreţiei. Agentul reglator major al secreţiei de glucagon este glucoza care inhibă secreţia de glucagon. O serie de alţi factori influenţează secreţia acestui hormon. Somatostatina, produsă de celule de tip D din insulele Langerhans, exercită un efect inhibitor asupra secreţiei glucagonului. Aminoacizii, agoniştii β adrenergici stimulează secreţia.

Acţiuni. Glucagonul exercită acţiuni metabolice opuse cu ale insulinei, rezultatul global al acestora fiind creşterea glicemiei. Acţiunile sale se exercită în primul rând la nivel hepatic, concentraţia sa în sângele portal fiind mai mare decât în sângele sistemic.

Efectele intracelulare ale glucagonului sunt mediate de AMPc a cărei concentraţie creşte sub acţiunea hormonului şi de protein kinaza A activată de AMP_c. Acţiunea principală a glucagonului este cea gluconeogenetică, sinteză de glucoză din precursori neglucidici. Glucagonul induce sinteza enzimelor cheie gluconeogenetice, fosfoenolpiruvat carboxikinază, fructozo-1, 6-bisfosfatază, glucozo-6-fosfatază. Prin activarea protein kinazei A şi conversia enzimelor în forme fosforilate, creşte fluxul de metaboliţi pe calea gluconeogenezei şi diminuează ritmul glicolizei.

Conversia glicogen fosforilazei şi a glicogen sintazei în forme fosforilate activează glicogenoliza şi inhibă sinteza de glicogen. Glucoza obţinută astfel trece în sânge, creşte glicemia.

Metabolismul lipidic în hepatocit este deplasat spre β - oxidarea acizilor graşi şi cetogeneză. Diminuarea glicolizei limitează cantitatea de acetil - CoA şi implicit şi de malonil - CoA. Absenţa malonil - CoA ridică inhibiţia pe care aceasta o exercită asupra carnitin-acil transferazei, acizii graşi cu catenă lungă pătrund în mitocondrii şi sunt supuşi β - oxidării şi sintezei de corpi cetonici. Conversia glucozei în acizi graşi şi sinteza de trigliceride este diminuată (acţiune antilipogenetică).

Glucagonul nu influenţează metabolismul glucidic în muşchi.

Un alt ţesut care răspunde la glucagon este ţesutul adipos. Prin creşterea concentraţiei AMP_c, este activată lipoliza şi inhibată lipogeneza. Acizii graşi eliberaţi în sânge sunt preluaţi de ficat unde sunt supuşi oxidării mitocondriale.

În diabet şi în inaniţie glucagonemia este crescută şi, respectiv, nivelul plasmatic al insulinei este scăzut (raport insulină/glucagon mic), metabolismul glucidic hepatic este deviat spre cetogeneză şi hiperglicemie (Fig. XII.27). Un raport insulină/glucagon ridicat, specific perioadelor de aport glucidic inversează evenimentele de mai sus, metabolismul hepatic este deplasat spre utilizarea glucozei (Fig. XII.28).

XII.6.3. SOMATOSTATINA

Acest hormon a fost descris iniţial ca factor hipotalamic care inhibă eliberarea somatotropinei hipofizare (GH-RIH). Ulterior somatostatina a fost identificată şi în pancreas (este produsă de celule D insulare), în tractul gastrointestinal, în creier.

Somatostatina este elaborată sub forma unui precursor cu greutate moleculară relativ mare. Prin prelucrarea acestuia rezultă două forme active ale somatostatinei, cuprinzând 28 şi respectiv, 14 resturi aminoacidice.

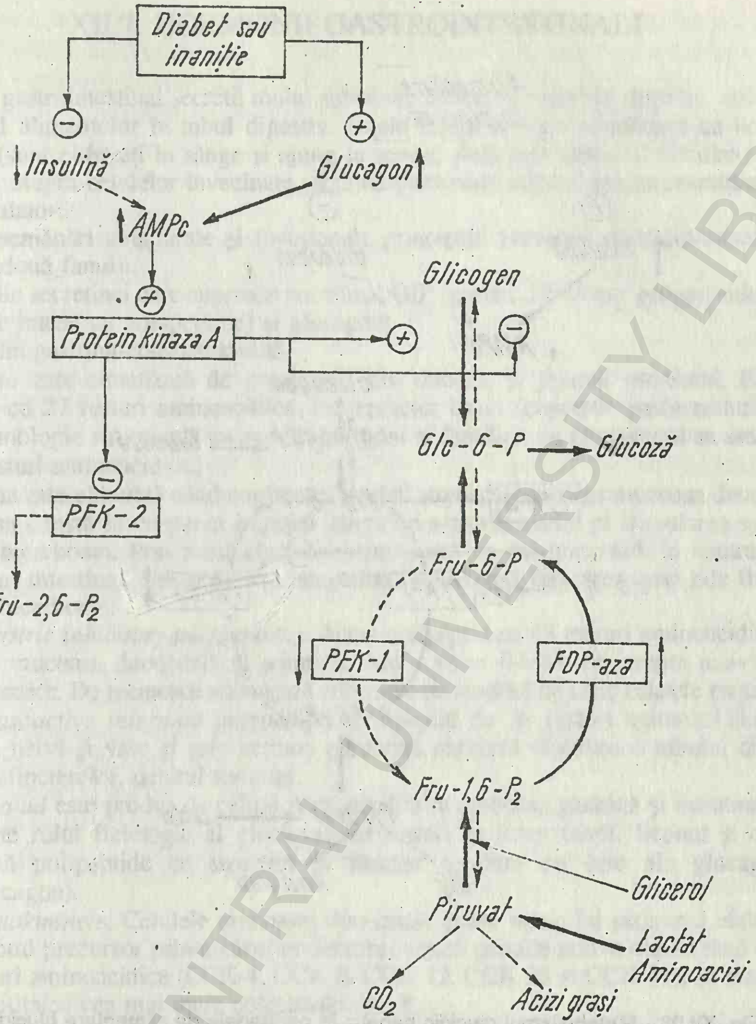


Fig. XII.27 - Metabolismul glucidic hepatic în diabet (sau inaniție), raport insulină/glucagon scăzut
PFK = fosfofructokinază 1 sau 2; FDPază = fructozo-1,6-bisfosfatază

Somatostatina prin acțiune paracrină inhibă secreția de glucagon, de insulină ca și a unor hormoni gastrointestinali, secretină, colecistokinină, GIP (gastric inhibitory polypeptide).

Somatostatina în creier are probabil funcție de neutrotransmițător.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

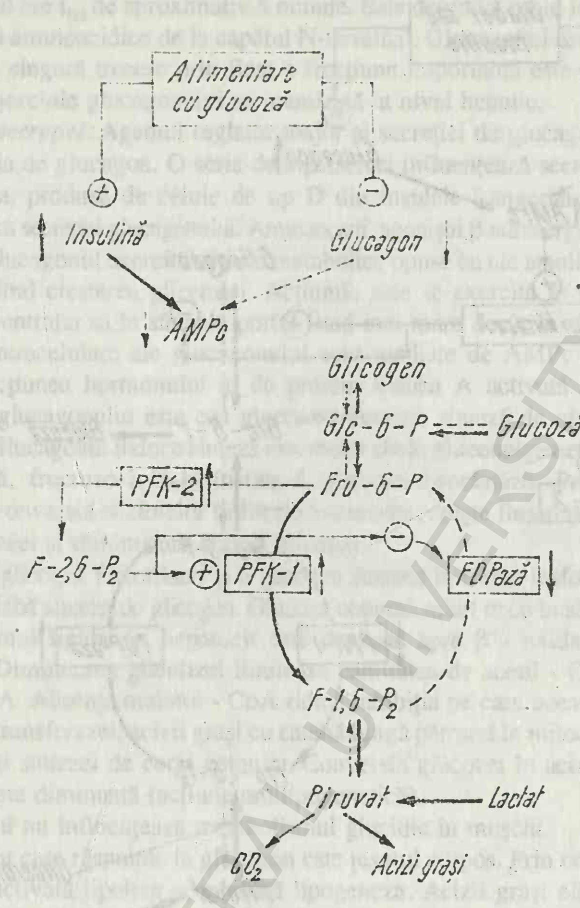


Fig. XII.28 - Metabolismul glucidic hepatic în perioadele de alimentare glucidică, raport insulină/glucagon ridicat.
PFK = fosfofructokinază 1 sau 2; FDP = fructozo-1,6-bisfosfatază

XII.6.4. POLIPEPTIDUL PANCREATIC

Acest compus este produs de celule de tip F din insulele Langerhans. Este un polipeptid cu 36 resturi aminoacidice. Funcţia sa nu este încă precizată. Se presupune că ar avea rol în secreţia de bicarbonat de către pancreas.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XII.7. HORMONII GASTROINTESTINALI

Tractul gastrointestinal secretă multe substanţe active cu roluri în digestie, absorbţie, în tranzitul alimentelor în tubul digestiv. Unele dintre acestea acţionează ca hormoni endocrini (sunt eliberaţi în sânge şi ajung la ţesutul ţintă prin sistemul circulator), alţii acţionează asupra celulelor învecinate (acţiune paracrină) sau ca neurotransmiţători sau neuromodulatori.

După asemănări structurale şi funcţionale principalii hormoni gastrointestinali sunt grupaţi în două familii:

1) familia secretinei care cuprinde secretina, GIP (gastric inhibitory polypeptide), VIP (vasoactive intestinal polypeptide) şi glucagon;

2) familia gastrină-colecistokinină.

Secretina este sintetizată de celule (S) din duoden şi jejunul proximal. Este un polipeptid cu 27 resturi aminoacidice, are caracter bazic (cuprinde patru resturi Arg). Prezintă omologie structurală cu ceilalţi hormoni ai familiei, cu glucagonul se aseamănă prin 14 resturi aminoacidice.

Secretina este eliberată când conţinutul acid al stomacului atinge mucoasa duodenală. Acţiunea sa constă în creşterea irigaţiei sanguine a pancreasului şi stimularea secreţiei de apă şi bicarbonat. Prin acest efect secretina joacă un rol important în neutralizarea conţinutului intestinal. De asemenea, secretina favorizează formarea unei bile fluide şi bogată în bicarbonat.

GIP (gastric inhibitory polypeptide). Acest polipeptid cu 43 resturi aminoacidice este produs de mucoasa duodenală şi jejunală. Are acţiune inhibitorie asupra activităţii şi secreţiei gastrice. De asemenea stimulează eliberarea de insulină de către celulele pancreatice.

VIP (vasoactive intestinal polypetide). Polipeptid cu 28 resturi aminoacidice. Este prezent în nervi şi vase şi prin acţiune paracrină reglează motilitatea tubului digestiv, relaxarea sfincterelor, debitul sanguin.

Glucagonul este produs de celule A răspândite în mucoasa gastrică şi intestinală. Nu se cunoaşte rolul fiziologic al glucagonului format la acest nivel. Ileonul şi colonul sintetizează polipeptide cu structuri şi funcţie similare cu cele ale glucagonului (enteroglucagon).

Colecistokininele. Celulele mucoasei duodenale şi ale jejunului proximal elaborează un polipeptid precursor prin a cărui prelucrare rezultă peptide active cuprinzând de la 4 la 39 resturi aminoacidice (CCK 4, CCK 8, CCK 12, CCK 33 şi CCK 39). În plasmă se află în cantitatea cea mai mare colecistokinina 8.

Secreţia de colecistokinină este declanşată de contactul mucoasei intestinale cu conţinutul stomacal cuprinzând produsele digestiei parţiale a alimentelor şi cu un pH acid. Colecistokinina acţionează ca hormon, stimulează secreţia pancreatică şi contracţia vezicii biliare.

Gastrina este elaborată în principal de mucoasa gastrică (regiunea antrală), de cea duodenală.

Există sub forma mai multor peptide cu 14, 17 sau 34 resturi aminoacidice (G_{14}, G_{17}, G_{34}). Fiecare gastrină cuprinde câte un rest tirozil şi există în formă sulfatată sau nesulfatată. Activitatea biologică rezidă în capătul C-terminal al peptidelor. Pentapeptidul C-terminal este identic în toate formele gastrinei ca şi ale colecistokininei.

Secreţia de gastrină este declanşată de stimularea vagului şi de contactul antrului piloric cu chimul. Gastrina stimulează secreţia de acid, de pepsină de către mucoasa gastrică, are acţiune hipertrofiantă asupra mucoasei şi creşte motilitatea gastrică.

Alte peptide active din tractul gastro-intestinal. Din tubul digestiv au fost izolate multe alte peptide care acţionează prin mecanisme paracrine şi neurocrine (prezenţa lor în sânge este nesemnificativă).

Substanța P (polipeptid cu 11 resturi aminoacidice) stimulează contracția musculaturii netede a intestinului. Somatostatina, inhibă secreția de gastrină, secretină, colecistokinină.

Motilina (polipeptid cu 22 resturi aminoacidice) elaborată de mucoasa intestinală stimulează secreția de acid și pepsină de către mucoasa gastrică și contracția mușchilor netezi intestinali.

XII.8. HORMONII MEDULOSUPRARENALIENI

Glandele suprarenale (adrenale) sunt alcătuite din două regiuni distincte cu origini embriologice, structuri și funcții diferite. Porțiunea corticală (90%) se dezvoltă din mezoderm și are o structură epitelială. Medulara (10%) este de origine nervoasă. Cortexul produce hormoni de natură steroidică, corticosteroizii. Medulara elaborează substanțe denumite catecolamine.

Medulara împreună cu sistemul nervos parasimpatic și simpatic alcătuiesc un sistem neuroendocrin - simpatoadrenal - cu rol în adaptarea organismului la diverse solicitări, acute sau cronice.

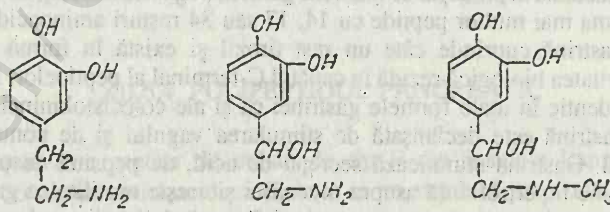
Medulara poate fi considerată o parte a sistemului nervos simpatic, un ganglion care și-a pierdut terminațiile axonale. Produșii elaborați de medulară - catecolaminele - sunt eliberați direct în sânge.

Medulara este alcătuită din celule denumite cromafine (feocromocite) datorită proprietăților lor tinctoriale. Cu acid cromic se colorează în brun, datorită oxidării catecolaminelor la melanine. Celulele cromafine au o origine embriologică comună cu celulele ganglionare ale sistemului nervos simpatic. Grupuri de celule cromafine se găsesc și în lungul nervilor simpatici din plămân, ficat, intestin etc. (celule cromafine ectopice).

Medulosuprarenala este inervată de fibre preganglionare ale sistemului nervos simpatic, fibre colinergice. Vascularizația se face printr-un sistem vascular portal ce se formează din capilarele din cortex. În acest sistem glucocorticoizii ating concentrații mult mai ridicate decât în circulația sistemică.

Structura chimică a catecolaminelor

Medulosuprarenala elaborează compuși denumiți catecolamine (cuprind nucleul catecolului, 1, 2 -dihidroxibenzen): dopamină, noradrenalină (norepinefrină) și adrenalină (epinefrină):



Dopamină   Noradrenalină   Adrenalină

Medulosuprarenala eliberează în sânge adrenalină (80% din secreţia totală) şi noradrenalină (20%). Noradrenalina îndeplineşte şi funcţia de neurotransmiţător la nivelul terminaţiilor nervilor postganglionari simpatici (terminaţii adrenergice) şi sângele cuprinde o fracţiune din noradrenalina eliberată pe această cale, cea care nu a fost recaptată imediat la nivelul sinapselor.

Celulele cromafine ectopice cuprind noradrenalină sintetizată in situ sau captată din sânge. Adrenalina nu este sintetizată în celulele cromafine extramedulare, dar poate fi prezentă în aceste celule prin captare din plasmă.

Dopamina este absentă în sânge. Ea se găseşte în anumite regiuni ale sistemului nervos central. Are rol de neurotransmiţător la nivelul unor terminaţii nervoase, dopaminergice.

Biosinteza catecolaminelor. Catecolaminele sunt obţinute din tirozină. Acest aminoacid rezultă prin hidroliza proteinelor endo sau exogene sau prin hidroxilarea fenilalaninei, aminoacid nutritiv esenţial.

Transformarea tirozină → adrenalină are loc prin patru reacţii ce au loc în granulele cromafine şi în citosolul celulelor cromafine (Fig. XII.29). Transformarea noradrenalină → adrenalină are loc în citosol, este catalizată de o metil - transferază (feniletanolamino-N-metil transferază) care utilizează ca donor de grupări metil S-adenozil-metionina. Reacţia are loc numai în celulele cromafine din medulară şi este controlată pozitiv de cortisolul (glucocorticoid) prezent în sângele portal care ajunge din cortex în medulară.

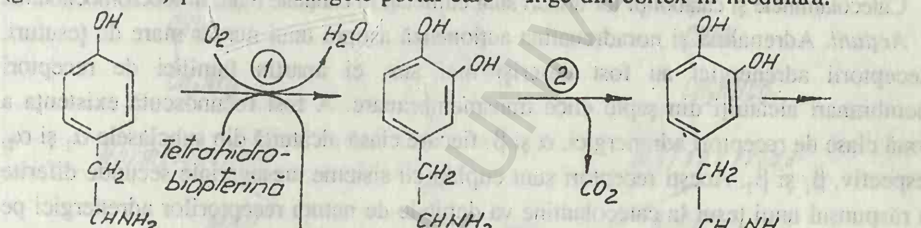


Fig. XII.29 - Biosinteza catecolaminelor
1) Tirozin hidroxilaza; 2) Dopa decarboxilaza (piridoxal fosfat dependentă); 3) dopamin hidroxilaza; 4) feniletanolamino-N-metil transferaza

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Depozitare şi secreţie. Celulele medulosuprarenaliene cuprind noradrenalină şi adrenalină depozitate împreună cu ATP-Mg^{2+}, ioni de Ca^{2+} şi o proteină specifică cromogranină, în granule (cromafine). Unele granule cuprind adrenalină, unele noradrenalină şi altele cuprind ambele catecolamine.

Prin stimularea nervoasă a medularei, dependentă de influxul ionilor de Ca^{2+}, conţinutul granulelor cromafine este eliberat în sânge (în principal adrenalina şi în cantitate mai mică noradrenalina). Sângele mai cuprinde noradrenalina ce a scăpat din sinapsele adrenergice şi cea eliberată din celulele cromafine ectopice.

Metabolismul catecolaminelor. Catecolaminele au o viaţă foarte scurtă, $t_{1/2}$ de 10-30 secunde. Activitatea catecolaminelor circulante este întreruptă rapid prin captare în ţesuturi, în principal în ficat şi în rinichi, şi metabolizare la compuşi inactivi secretabili. Cantităţi mici de catecolamine sunt eliminate ca atare pe cale renală.

Catabolismul catecolaminelor are loc cu participarea a două enzime, catecol-O-metil transferază (COMT) şi monoamin oxidază (MAO) (Fig. XII.30). Sub acţiunea combinată a acestor enzime rezultă în final atât din adrenalină cât şi din noradrenalină, catabolitul denumit acid 3-metoxi-4-hidroxi-mandelic (acid vanilmandelic). În urină, alături de acid vanilmandelic, se află şi cataboliţi intermediari.

Catecolaminele şi cataboliţii lor urinari sunt eliminaţi în cantitate mare în feocromocitoame.

Acţiuni. Adrenalina şi noradrenalina acţionează asupra unui număr mare de ţesuturi. Receptorii adrenergici au fost descrişi mai sus, ei aparţin familiei de receptori membranari alcătuiţi din şapte elice transmembranare. A fost recunoscută existenţa a două clase de receptori adrenergici, α şi β, fiecare clasă alcătuită din subclasele α_1 şi α_2, respectiv, β_1 şi β_2. Aceşti receptori sunt cuplaţi cu sisteme mesageriale secunde diferite şi răspunsul unui ţesut la catecolamine va depinde de natura receptorilor adrenergici pe care îi posedă ca şi de natura sistemelor efectoare proprii fiecărui tip de celulă.

Receptorii β_1 şi β_2 sunt cuplaţi cu adenilat ciclază prin intermediul proteinei G_s, cu acţiune stimulatoare şi ocuparea acestor receptori determină creşterea concentraţiei intracelulare de AMP_c; receptorii α_2, cuplaţi cu o proteină G_i cu efecte negative asupra adenilat ciclazei, determină scăderea concentraţiei AMP_c. Ocuparea receptorilor α_1 determină o creştere a concentraţiei intracelulare a Ca^{2+}fie prin influx din spaţiul extracelular, fie prin eliberare din depozite (mediată de inozitol trisfosfat). În tabelul XII.5 sunt arătate acţiunile catecolaminelor în diverse ţesuturi şi natura receptorilor care mediază aceste efecte.

Prin acţiunile asupra sistemului circulator, asupra metabolismului energogen, prin reglarea secreţiei anumitor hormoni, catecolaminele au roluri importante în adaptarea organismului la agresiuni interne sau externe, fizice sau psihice (frig, emoţii, anoxie, hipoglicemie etc.). Efectele metabolice, mediate în principal de către adrenalină, au ca rezultat creşterea consumului de oxigen şi a producţiei de ATP şi căldură la nivelul a numeroase ţesuturi. La nivelul musculaturii scheletice este activată glicogenoliza care eliberează substratul glicolizei. La nivel hepatic glicogenoliza şi gluconeogeneza furnizează glucoză pentru menţinerea glicemiei şi asigurarea combustibilului pentru creier. În ţesutul adipos este stimulată lipoliza care furnizează acizi graşi pentru uzul

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

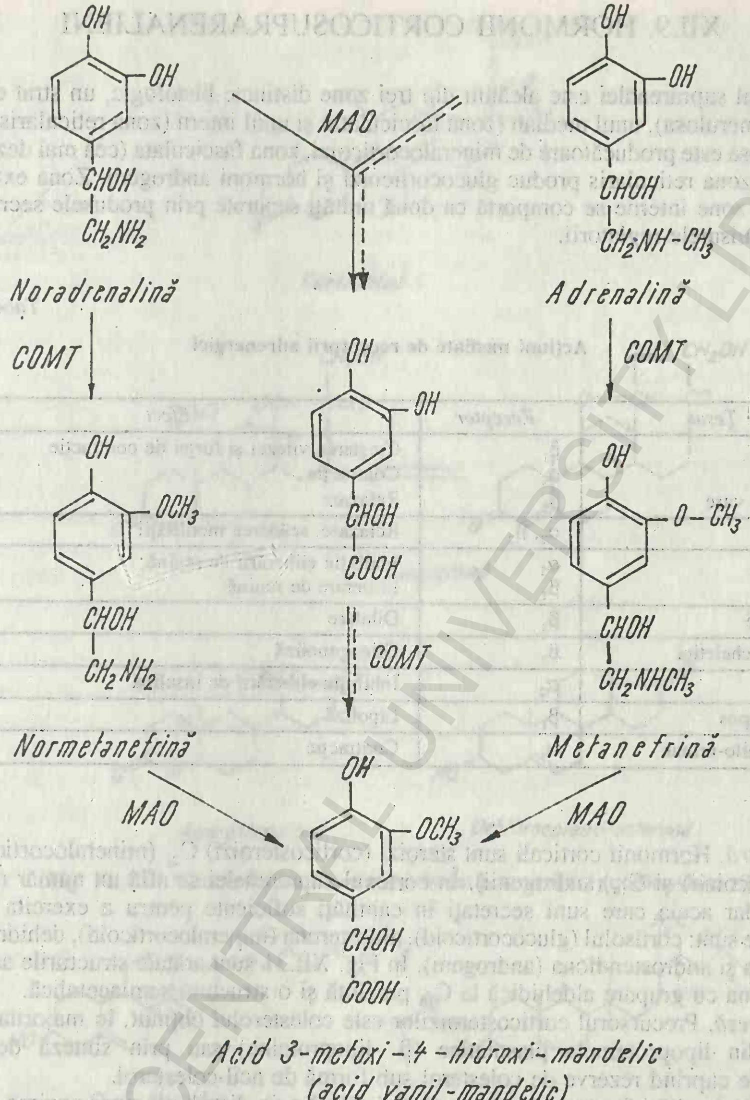


Fig. XII.30 - Catabolismul catecolaminelor
COMT = Catecol-O-metil transferază; MAO = Monoaminoxidază

ţesuturilor periferice şi glicerol, substrat gluconeogenetic. Inhibiţia secreţiei de insulină reduce consumul de glucoză sanguină de către ţesuturile periferice, aceasta rămânând disponibilă pentru creier.

Medulasuprarenala nu este esenţială pentru viaţă, dar în absenţa secreţiei medulare organismul este inapt de a face faţă diverşilor factori stresanţi care acţionează permanent.

XII.9. HORMONII CORTICOSUPRARENALIENI

Cortexul suprarenalei este alcătuit din trei zone distincte histologic, un strat exterior (zona glomerulosa), unul median (zona fasciculata) şi unul intern (zona reticularis). Zona glomerulosa este producătoare de mineralocorticoizi, zona fasciculata (cea mai dezvoltată la om) şi zona reticularis produc glucocorticoizi şi hormoni androgeni. Zona externă şi cele două zone interne se comportă ca două unităţi separate prin produsele secretate şi prin mecanismele reglatorii.

Tabeul XII.5

Acţiuni mediate de receptorii adrenergici

Ţesut	*Receptor*	*Efect*
Miocard	β_1	Creşterea vitezei şi forţei de contracţie
Muşchi neted din vase	α_s β_2	Contracţie Relaxare
Intestin	α_2, β_2	Relaxare, scăderea motilităţii
Rinichi	α_2 β_2	Inhibiţia eliberării de renină Eliberare de renină
Bronhiole	β_2	Dilatare
Muşchi scheletici	β_2	Glicogenoliză
Pancreas	α_2	Inhibiţia eliberării de insulină
Ţesut adipos	β_1	Lipoliză
Tract genito-urinar	α_1	Contracţie

Structură. Hormonii corticali sunt steroizi (corticosteroizi) C_{21} (mineralocorticoizii şi glucocorticoizii) şi C_{19} (androgenii). În cortexul suprarenalei se află un număr mare de steroizi, dar aceia care sunt secretaţi în cantităţi suficiente pentru a exercita acţiuni hormonale sunt: cortisolul (glucocorticoid), aldosterona (mineralocorticoid), dehidroepiandrosterona şi androstendiona (androgeni). În Fig. XII.31 sunt arătate structurile acestora. Aldosterona cu grupare aldehidică la C_{18} prezintă şi o structură semiacetalică.

Biosinteză. Precursorul corticosteroizilor este colesterolul obţinut, în majoritate, prin captare din lipoproteinele plasmatice (β -lipoproteine) sau prin sinteză de novo. Adrenalele cuprind rezerve de colesterol sub formă de acil-colesterol.

Cele două unităţi funcţionale ale corticalei diferă prin distribuţia unor enzime ceea ce face ca aldosterona să fie sintetizată numai în zona glomerulosa (lipsită de 17α -hidroxilază); cortisolul şi androgenii se formează numai în zona internă (aceasta nu posedă 18-hidroxi-dehidrogenaza, necesară sintezei aldosteronei).

Etapa comună pentru sinteza corticosteroizilor este transformarea colesterolului în pregnenolonă sub acţiunea unei enzime ce cuprinde citocromul P-450 scc (de la side chain cleavage). Procesul decurge intramitocondrial prin hidroxilare succesivă la C_{22} şi C_{20}, scindarea legăturii C_{20}-C_{22} şi eliberarea unui fragment C6 (aldehidă izocaproică) (Fig. XII.32). De la pregnenolonă se ramifică secvenţele care duc la glucocorticozi, mineralocorticoizi şi la androgeni (Fig. XII.33).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

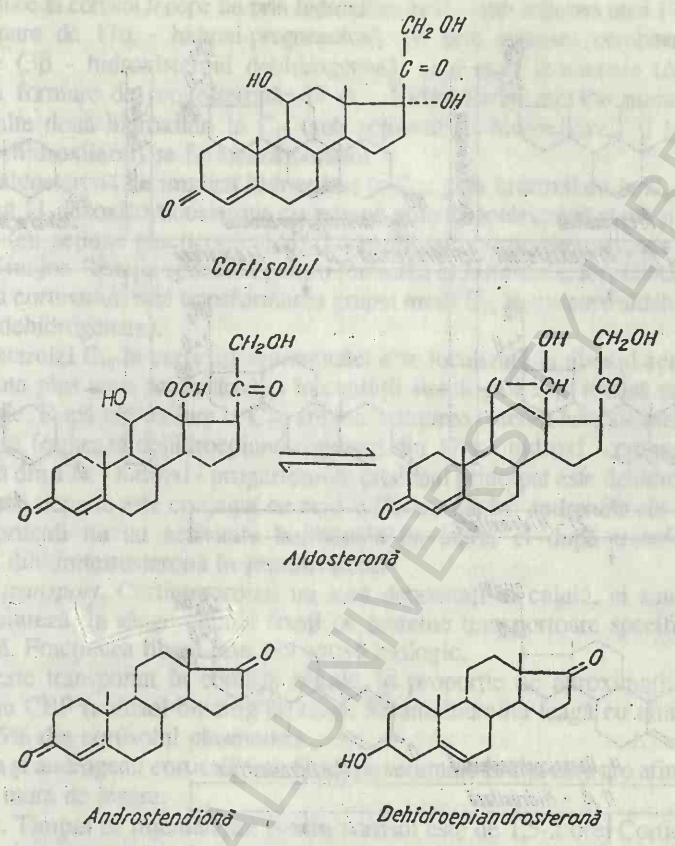


Fig. XII.31 - Structurile hormonilor corticosuprarenalieni (corticosteroizi)

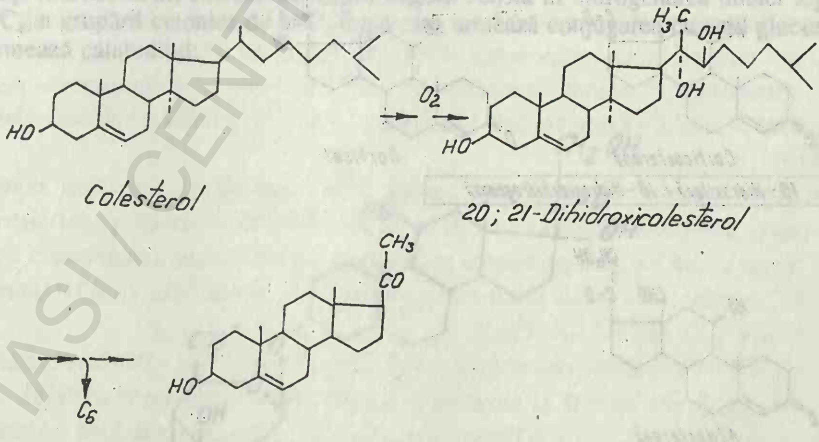


Fig. XII.32 - Transformarea colesterolului în pregnenolenă

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

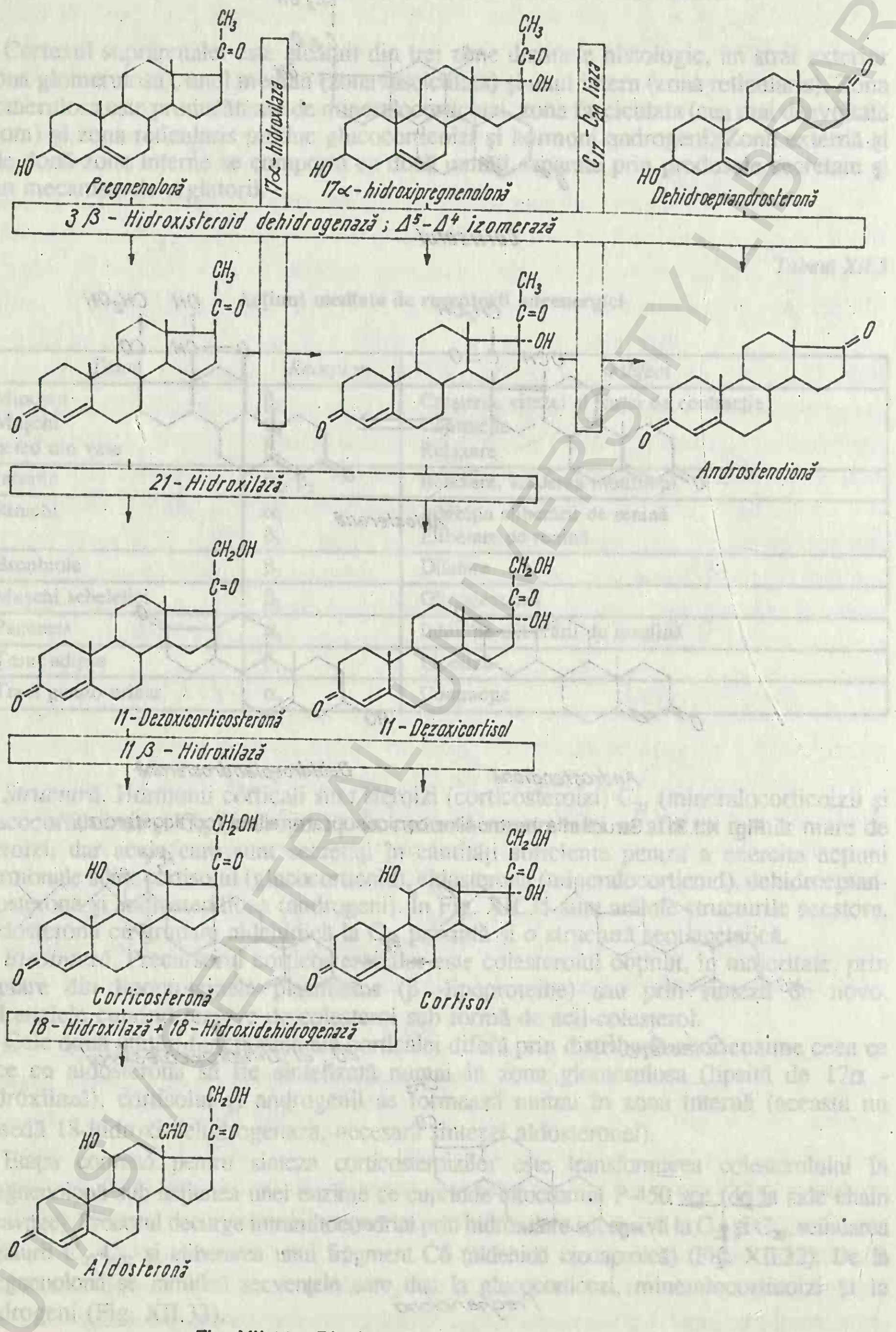


Fig. XII.33 - Biosinteza hormonilor corticosteroizi

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Calea care duce la cortisol începe fie prin hidroxilare la C_{17} (sub acţiunea unei 17 α - hidroxilaze) şi formare de 17α - hidroxi-pregnenolonă, fie prin acţiunea combinată a unei dehidrogenaze (3β - hidroxisteroid dehidrogenază) şi a unei izomeraze ($\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ - izomerază) cu formare de progesteronă. 17 α - Hidroxilarea are loc numai în zona internă. Prin alte două hidroxilări la C_{21} (sub acţiunea 21-hidroxilazei) şi la C_{11} (sub acţiunea 11β - hidroxilazei) se formează cortisol.

Sinteza de aldosteronă nu implică hidroxilare la C_{17}; prin hidroxilare la C_{21} şi apoi la C_{11} se formează 11-dezoxicorticosterona cu acţiune mineralocroticoidă slabă şi respectiv, corticosterona (cu acţiune glucocorticoidă). La rozătoare, corticosterona este hormonul glucocorticoid major. Reacţia specifică pentru formarea aldosteronei, localizată la nivelul zonei externe a cortexului, este transformarea grupei metil C_{18} în grupare aldehidică (prin hidroxilare şi dehidrogenare).

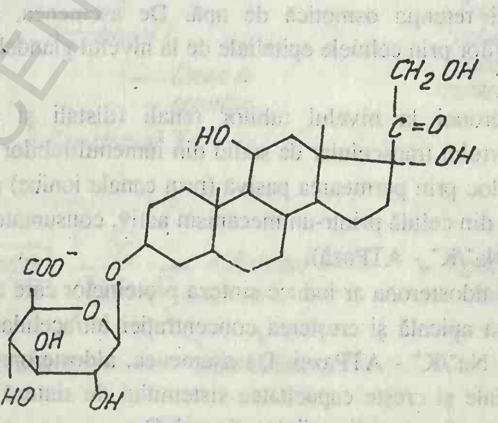
Sinteza de steroizi C_{19} în cortexul suprarenalei este localizată la nivelul zonei interne (zona fasciculata plus zona reticularis) şi în condiţii fiziologice este redusă cantitativ şi fără semnificaţie. După hidroxilare la C_{17}, are loc detaşarea catenei laterale (sub acţiunea unei liaze) şi se formează dehidroepiandrosteronă din 17α - hidroxi - pregnenolonă şi androstendionă din 17α - hidroxi - progesteronă; produsul principal este dehidroepiandrosterona, care mai departe este conjugat cu acid sulfuric, atât în andrenale cât şi în ficat. Androgenii corticali nu au activitate hormonală ca atare, ci după transformare în testosteronă şi dihidrotestosteronă în ţesuturi ţintă.

Secreţie şi transport. Corticosteroizii nu sunt depozitaţi în celulă, ei sunt secretaţi imediat după sinteză. În sânge circulă fixaţi pe proteine transportoare specifice sau pe serumalbumină. Fracţiunea liberă este cea activă biologic.

Cortisolul este transportat în condiţii bazale, în proporţie de aproximativ 70%, de transcortină sau CBP (cortisol-binding protein). Serumalbumina leagă cu afinitate mică aproximativ 15% din cortisolul plasmatic.

Aldosterona şi androgenii corticali sunt fixaţi pe serumalbumină care are afinitate mică dar capacitate mare de legare.

Metabolism. Timpul de înjumătăţire pentru cortisol este de 1,5-2 ore. Corticosteroizii sunt catabolizaţi printr-o varietate mare de reacţii care îi inactivează şi îi transformă în compuşi hidrosolubili, excretabili. Calea majoră constă în hidrogenarea dublei legături de la C_4, a grupării cetonice de la C_3 după care urmează conjugarea cu acid glucuronic. Se formează catabolitul:



Acţiuni. Corticosteroizii utilizează receptori intracelulari care acţionează la nivelul genomului ceular. Receptorul pentru cortisol este prezent în aproape toate celulele şi acest hormon influenţează un număr foarte mare de procese. Deşi structura receptorului ca şi elementele reglatoare din cromatină cu care interacţionează complexul cortisol-receptor (CRE- cortisol-responsive element) sunt bine caracterizate, puţine din efectele biologice ale cortisolului pot fi explicate la nivel molecular. Au fost descrise numeroase proteine a căror sinteză este indusă sau represată de cortisol. Astfel de proteine sunt: tirozinaminotransferaza, triptofan oxigenaza, proopiomelanocortina, transferina, lipocortina.

Cortisolul exercită acţiuni metabolice antagonice cu ale insulinei şi care sunt evidente în deosebi în perioadele de foame, de solicitări susţinute.

La nivel hepatic, cortisolul stimulează gluconeogeneza prin aport crescut de materii prime (aminoacizi din muşchi şi glicerol din ţesutul adipos), dar şi prin inducţia unor enzime gluconeogenetice. Glucoza este parţial depozitată ca glicogen, parţial trece în sânge. Efluxul glucozei are un efect hiperglicemiant fiind corelat şi cu o captare redusă a glucozei în muşchi şi în ţesutul adipos.

În muşchii scheletici, cortisolul exercită o acţiune catabolică asupra proteinelor, aminoacizii eliberaţi constituind substratul gluconeogenezei hepatice.

Cortisolul are acţiuni catabolice şi asupra ţesutului adipos periferic, lipoliza eliberând în sânge acizi graşi şi glicerol.

Cortisolul (hidrocortizona) exercită acţiuni importante asupra sistemelor de apărare imunologic şi inflamator. Cortisolul scade amplitudinea numărului de limfocite, alterează funcţiile mediatoare şi efectoare ale acestor celule. Acţiunile antiinflamatoare ale cortisolului sunt rezultatul reducerii numărului de leucocite (în special polimorfonucleare) la sediul injuriei, inhibă proliferarea fibroblaştilor, inhibă fosfolipaza A_2 întrerupând astfel cascada arahidonatului şi producţia de prostaglandine şi de leucotriene.

Aldosterona participă la menţinerea homeostaziei hidrice şi electrolitice. Ţesutul principal ţintă pentru aldosteronă este rinichiul, la nivelul căruia determină retenţia ionilor Na^+ şi în mod secundar promovează eliminarea renală de H^+, K^+ şi NH_4^+. Retenţia de sodiu antrenează şi retenţia osmotică de apă. De asemenea, aldosterona reglează transportul electroliţilor prin celulele epiteliale de la nivelul glandelor salivare, glandelor sudoripare, intestin.

Acţiunea aldosteronei la nivelul tubilor renali (distali şi colectori) constă în promovarea transportului transcelular de sodiu din lumenul tubilor în spaţiul interstiţial. Acest transport are loc prin permearea pasivă (prin canale ionice) a membranei apicale. Ionii Na^+ sunt scoşi din celulă printr-un mecanism activ, consumator de ATP (pompa de sodiu acţionată de Na^+/K^+ - ATPază).

Există dovezi că aldosterona ar induce sinteza proteinelor care alcătuiesc canalele de sodiu din membrana apicală şi creşterea concentraţiei intracelulare a sodiului, dar nu intervine în sinteza Na^+/K^+ - ATPazei. De asemenea, aldosterona induce sinteza unor proteine mitocondriale şi creşte capacitatea sistemului de sinteză a ATP-ului, care va asigura energia necesară scoaterii sodiului din celulă.

Controlul secreţiei. Sinteza şi secreţia de cortisol sunt reglate prin trei mecanisme care se întrepătrund şi a căror contribuţie depinde de starea fiziologică, de gradul de solicitare a organismului.

Nivelul plasmatic al cortisolului suferă o variaţie diurnă (ritm circadian), probabil rezultat al alternanţei perioadelor de alimentare, de veghe-somn. Nivelul maxim al cortisolemiei este atins în intervalul 6-8 a.m., perioada de trezire din somn; minimul este situat spre seară (în jurul orei 6 p.m.).

Un al doilea mecanism de control cuprinde axul hipotalamohipofizar. Corticotropina hipofizară (ACTH) controlează sinteza de steroizi la nivelul detaşării catenei laterale şi formării pregnenolonei. Secreţia de ACTH se află la rândul ei sub controlul hormonului hipotalamic eliberator, CRH. Cortisolul plasmatic, produs al stimulării prin CRH şi ACTH, inhibă rapid secreţia de CRH, şi mai lent, pe cea de ACTH (se presupune prin inhibiţia transcrierii genei, proopiomelanocortinei, precursor al ACTH).

Un al treilea mecanism de control este operaţional în stările de stress. Solicitările emoţionale, durerea, pe căi nervoase superioare mediază eliberarea de CRH şi de ACTH. Aceste răspunsuri pot depăşi controlul prin feed-back negativ sau ritmul circadian. Efectele metabolice declanşate de cortisol furnizează organismului mijloacele de a răspunde la stress. Acest răspuns este mai lent decât cel mediat de catecolamine, dar are o durată mai lungă şi cu ecouri mai adânci în metabolism.

Controlul secreţiei de aldosteronă are loc prin mecanisme distincte de acelea care operează în cazul glucocorticoizilor. Acest control se realizează prin sistemul renină-angiotensină, care are un rol deosebit în reglarea volumului fluidului extracelular şi a presiunii sângelui (Fig. XII 34). Renina este o enzimă proteolitică produsă de celulele aparatului juxtaglomerular şi eliberată în sânge sub influenţa unui număr de factori, de presiunea sângelui, de concentraţia sanguină a clorurii de sodiu. În plasmă, renina

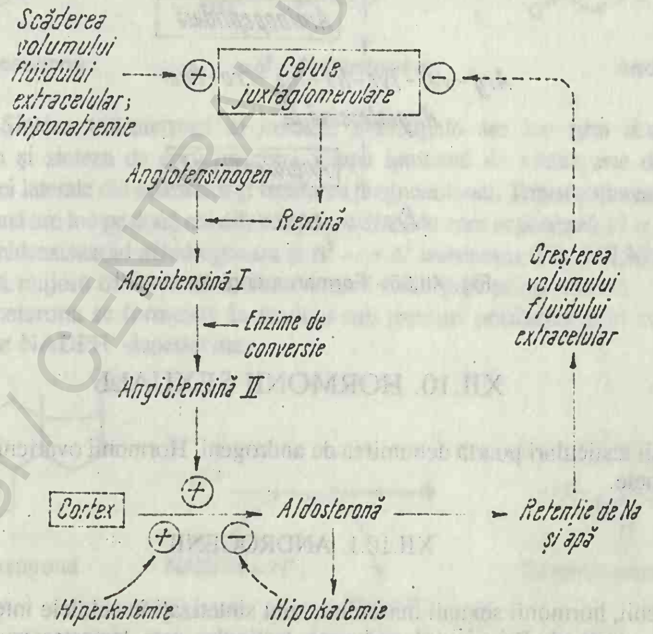


Fig. XII.34 - Reglarea secreţiei de aldosteronă

acţionează asupra unei proteine plasmatice angiotensinogen, din care detaşează un decapeptid, angiotensina I (Fig. XII.35). Aceasta din urmă, sub acţiunea unei alte enzime plasmatice (enzimă de conversie) este transformată într-un octapeptid, angiotensină II. Angiotensina II este o substanţă vasoactivă foarte puternică prin constricţia arteriolelor. La nivelul zonei glomerulosa, angiotensina II determină eliberarea aldosteronei. Creşterea nivelului plasmatic al aldosteronei determină retenţie de sodiu şi secundar creşterea volumului şi a presiunii sângelui. Timpul de acţiune al angiotensinei II este foarte scurt, este degradată rapid sub acţiunea angiotensinazei.

Un alt mecanism de control al secreţiei de aldosteronă, independent de sistemul renină-angiotensină, operează prin concentraţia ionilor K^+. O uşoară creştere a kalemiei stimulează secreţia de aldosteronă care prin acţiune kaliurică va restabili valoarea kalemiei. Scăderea kalemiei, din contra, inhibă secreţia de aldosteronă.

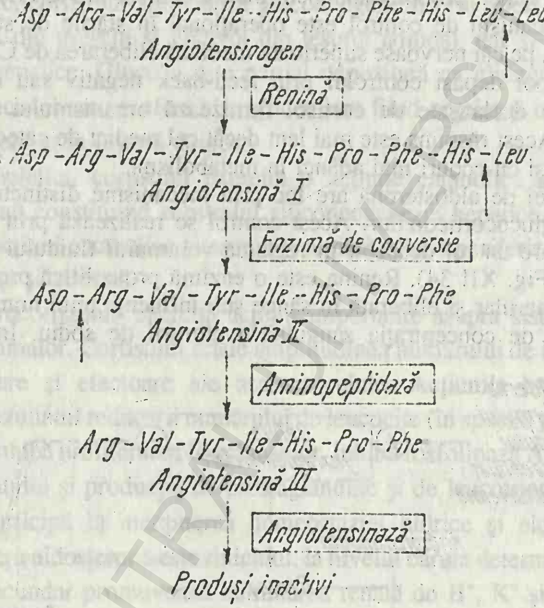


Fig. XII.35 - Formarea angiotensinei II

XII.10. HORMONII SEXUALI

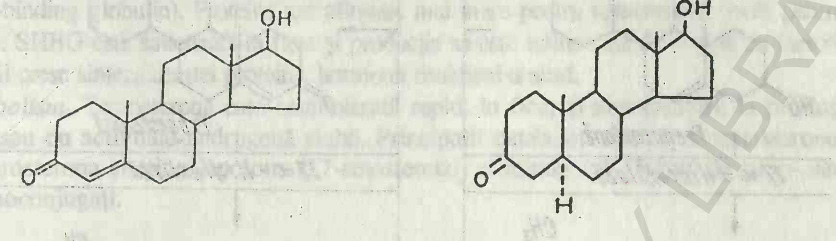
Hormonii testiculari poartă denumirea de androgeni. Hormonii ovarieni sunt estrogenii şi progestinele.

XII.10.1. ANDROGENII

Androgenii, hormonii sexuali masculini, sunt sintetizaţi în celulele interstiţiale (celule Leydig) din testicul. Principalul androgen testicular este testosterona; testiculul mai secretă cantităţi mici de dihidrotestosteronă. Acesta din urmă se formează şi în ţesuturile

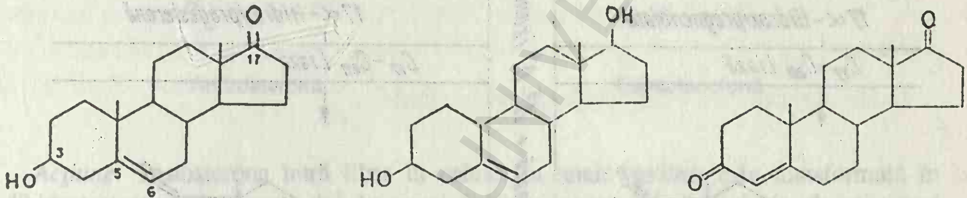
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ţintă, din testosterona circulantă. Testosterona şi dihidrotestosterona sunt steroizi C_{19} şi au formulele:



Testosteronă Dihidrotestosteronă

Alţi steroizi C_{19} produşi de cotexul suprarenalei, intermediari în sinteza testosteronei în testicul sau rezultaţi prin transformări periferice ale hormonilor circulanţi au activitate androgenică mai mare sau mai mică. Acestea sunt dehidroepiandrosterona, Δ^5 - androstendiol şi androstendionă:

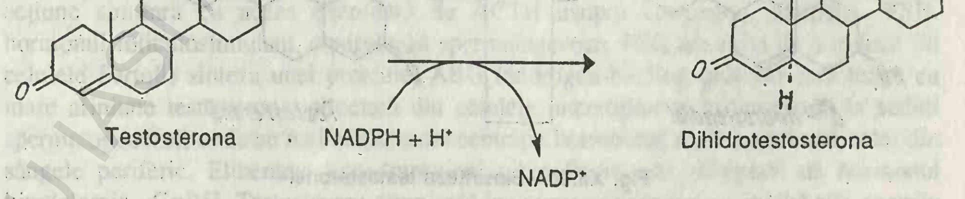


Dehidroepiandrosterona Δ^5 - Androstendiol Androstendionă

Biosinteză. Sinteza testosteronei în celulele interstiţiale are loc prin aceleaşi reacţii intermediare ca şi sinteza de corticosteroizi. Etapa limitantă de viteză este de asemenea, scindarea catenei laterale din colesterol şi formarea pregnenolonei. Transformarea pregnenolonei în testosteronă are loc pe două căi diferite prin ordinea în care acţionează 17 α - hidroxilaza şi cuplul 3 β - hidroxisteroid dehidrogenaza şi Δ^5 ---> Δ^4 izomeraza (Fig. XII.36).

La om calea majoră de formare a testosteronei trece prin progesteronă.

Dihidrotestosterona se formează în testicul sau ţesuturi periferice prin acţiunea unei 5 α - reductaze NADPH -dependente:



Testosterona Dihidrotestosterona

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

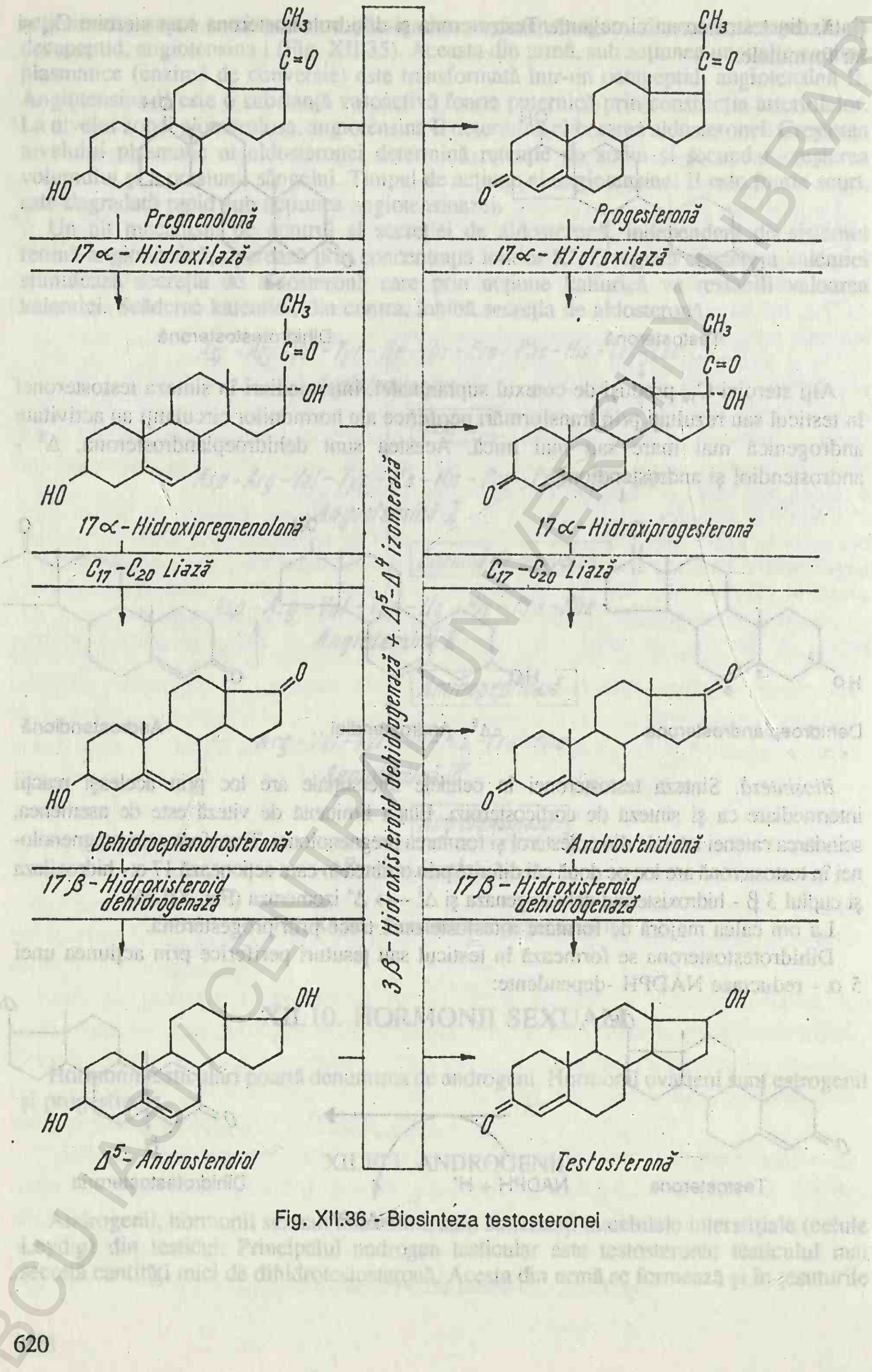
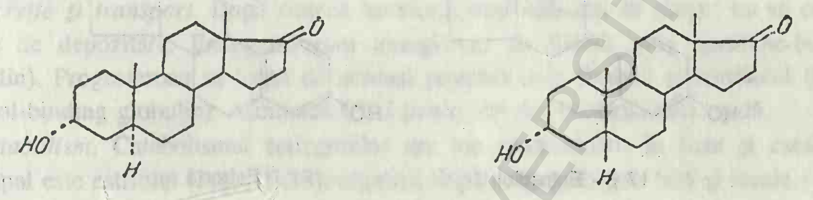


Fig. XII.36 - Biosinteza testosteronei

Secreţie şi transport. Hormonul este eliberat în sânge pe măsură ce se formează; nu există forme de depozitare. Transportul plasmatic este efectuat de o proteină care leagă atât testosterona cât şi esterogenii - SHBG (sex hormone-binding globulin) sau TEBG (testosterone-estrogen-binding globulin). Proteina are afinitate mai mare pentru testosteronă decât pentru estrogeni. SHBG este sintetizată în ficat şi producţia sa este influenţată de o serie de factori. Estrogenii cresc sinteza acestei proteine, hormonii tiroidieni o scad.

Metabolism. Testosterona este catabolizată rapid, în ficat şi alte ţesuturi, la produşi inactivi sau cu activitate androgenă slabă. Principalii cataboliţi urinari ai testosteronei sunt androsterona şi etiocolanolona (17-cetosteroizi) eliminaţi sub formă de sulfo- sau glucuronoconjugaţi:



Androsteronă Etiocolanolonă

Acţiune. Testosterona intră liber în celule. În unele ţesături este transformată în dihidrotestosteronă. Aceşti doi hormoni interacţionează cu acelaşi tip de receptori intracelulari, dihidrotestosterona având afinitate mai mare decât testosterona. Complexul hormon-receptor interacţionează cu cromatina şi activează transcrierea unor gene. Proteinele sintetizate mediază efectele biologice ale hormonului. Nu este cunoscut dacă toate acţiunile testosteronei sunt expresia sintezei unor proteine specifice.

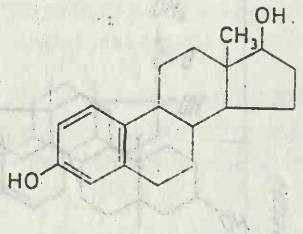
Testosterona controlează procesele fundamentale necesare dezvoltării şi funcţionării organelor sexuale, apariţiei şi întreţinerii caracterelor sexuale secundare, spermatogenezei. Androgenii stimulează sinteza proteică, acţiune deosebit de puternică la pubertate, care duce la dezvoltarea oaselor şi muschiulaturii scheletice.

Controlul secreţiei. Dezvoltarea şi funcţia secretoare a organelor sexuale masculine sunt controlate printr-un mecanism de feedback negativ la care participă gonadotroprinele hipofizare, LH şi FSH, hormonul eliberator hipotalamic, GnRH şi testosterona circulantă. LH, hormonul luteinizant, stimulează sinteza de testosteronă în celulele interstiţiale, acţiune similară cu aceea exercitată de ACTH asupra cortexului adrenalei. FSH, hormonul foliculostimulant, controlează spermatogeneza. FSH are rolul de a induce (în celulele Sertoli) sinteza unei proteine, ABG (androgen-binding protein) care leagă cu mare afinitate testosterona, eliberată din celulele interstiţiale şi o transportă la sediul spermatogenezei, unde se realizează o concentraţie hormonală mult superioară celei din sângele periferic. Eliberarea gonadotropinelor hipofizare este stimulată de hormonul hipotalamic - GnRH. Testosterona circulantă în concentraţii mai mari inhibă atât secreţia de gonadotropine hipofizare ca şi eliberarea GnRH în sistemul portal hipofizar.

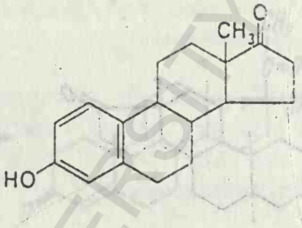
XII.10.2. HORMONII OVARIENI

Aceşti hormoni aparţin la două grupe, estrogenii şi progestinele. Pe lângă sinteza ovariană, estrogenii se mai formează în cantităţi mici în adrenale, testicul şi alte ţesuturi ca ficat, piele. În timpul gestaţiei unitatea feto-placentară sintetizează cantităţi mari de progesteronă.

Structură: Principalul hormon estrogen de origine ovariană este 17 β - estradiolul. În ţesuturile extraovariene se formează mai ales estronă. Estrogenii sunt steroizi C_{18}, cu caracter aromatic, sunt acizi foarte slabi:

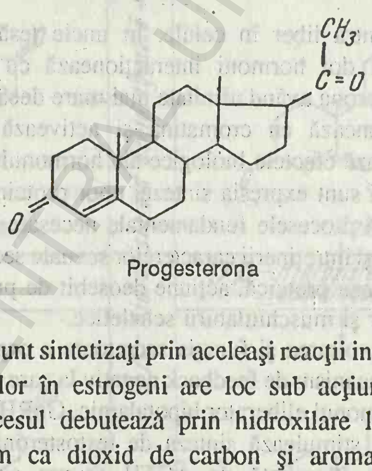


17 β - Estradiol



Estronă

Hormonul progestativ este progesterona, steroid C_{21}:



Progesterona

Biosinteză. Estrogenii sunt sintetizaţi prin aceleaşi reacţii intermediare ca şi androgenii. Transformarea androgenilor în estrogeni are loc sub acţiunea unui sistem enzimatic denumit aromatază. Procesul debutează prin hidroxilare la C_{19} după care urmează îndepărtarea acestui atom ca dioxid de carbon şi aromatizarea nucleului A. Prin aromatizarea testosteronei se obţine 17 β -estradiol; androstendiona dă naştere la estronă. Estrona şi estradiolul se transformă reversibil unul în celălalt sub acţiunea unei 17 β - reductaze (Fig. XII.37).

Progesterona, intermediar în sinteza tuturor hormonilor steroidici, se obţine aşa cum s-a arătat mai înainte.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

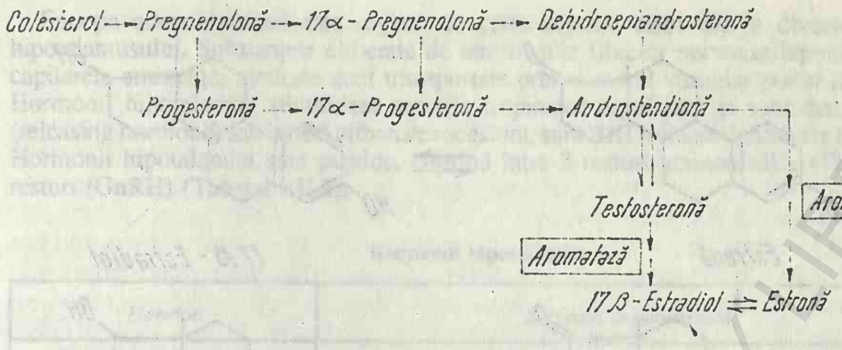
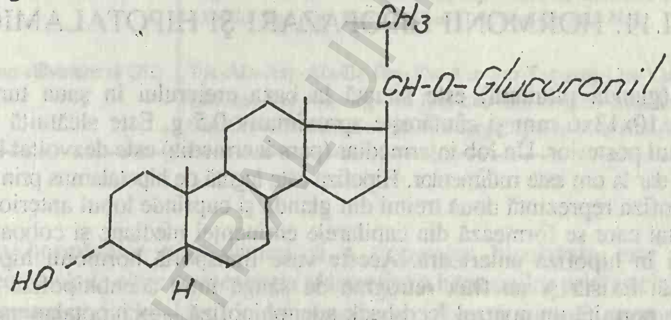


Fig. XII.37 - Biosinteza estrogenilor

Secreţie şi transport. După sinteză hormonii sunt eliberaţi în sânge; nu se cunosc forme de depozitare. Estrogenii sunt transportaţi de SHGB (sex hormone-binding globulin). Progesterona se leagă de aceeaşi proteină care fixează şi cortisolul (CBG-cortisol-binding globulin). Afinitatea CBG pentru cei doi hormoni este egală.

Catabolism. Catabolismul estrogenilor are loc predominant în ficat şi catabilitul principal este estriolul (Fig. XII.38), eliminat după conjugare prin bilă şi fecale.

Catabolitul principal al progesteronei este pregnandiolul, eliminat pe cale renală sub formă de 20-glucuronid:



Acţiuni biologice. Hormonii ovarieni ca şi alţi hormoni steroidici, interacţionează cu receptori intracelulari şi determină transcrierea unor gene specifice. Totuşi hormonii ovarieni exercită multe alte acţiuni care nu pot fi explicate prin acest mecanism.

Hormonii ovarieni controlează dezvoltarea aparatului reproducător femenin, apariţia şi menţinerea caracterelor sexuale secundare, reglează ciclul ovarian, fecundarea, gestaţia, naşterea şi lactaţia. Estrogenii şi progesterona acţionează fie sinergic, fie antagonist.

Controlul secreţiei. Sinteza şi secreţia hormonilor ovarieni este reglată de gonadotropinele hipofizare, LH şi FSH, de GnRH. LH stimulează producţia de estrogeni şi progesteronă de către ovar, controlează ciclul ovarian; FSH stimulează secreţia de estrogeni, dezvoltarea foliculilor ovarieni.

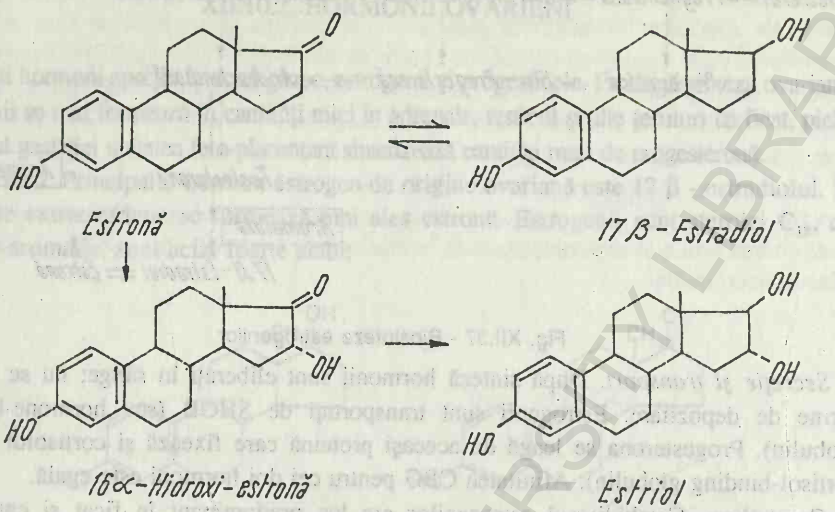


Fig. XII.38 - Catabolismul estrogenilor

XII.11. HORMONII HIPOFAZARI ŞI HIPOTALAMICI

Hipofiza (glanda pituitară) este situată la baza creierului în şaua turcească. Are dimensiunile 10x13x6 mm şi cântăreşte aproximativ 0,5 g. Este alcătuită dintr-un lob anterior şi altul posterior. Un lob intermediar (pars inermedia) este dezvoltat la majoritatea vertebratelor, dar la om este rudimentar. Hipofiza este legată de hipotalamus prin tija pituitară.

Adenohipofiza reprezintă două treimi din glandă şi cuprinde lobul anterior şi sistemul vascular portal care se formează din capilarele eminenţei mediane şi coboară prin vene portale lungi în hipofiza anterioară. Aceste vase transportă hormonii hipotalamici la adenohipofiză. Există şi un flux retrograd de sânge între adenohipofiză şi eminenţa mediană care permite un control feed-back adenohipofiză --→ hipotalamus.

Lobul posterior al hipofizei împreună cu nucleii paraventricular şi supraoptic din hipotalamus şi conexiunile nervoase între aceste structuri alcătuiesc o unitate funcţională -neurohipofiza.

XII.11.1. HORMONII ADENOHIPOFIZARI

Adenohipofiza produce şi secretă hormoni care reglează dezvoltarea şi funcţiile altor glande endocrine (hormoni tropi sau tropine) sau au rol în reglarea proceselor metabolice fundamentale din ţesuturi periferice:

- somatotropina, hormonul de creştere, GH (growth hormone);
- corticotropina, ACTH (adrenocroticotropic hormone);
- gonadotropine, LH (luteinizing hormone) şi FSH (follicle stimulating hormone);
- tireotropina, TSH (thyroide-stimulating hormone);
- prolactina, PRL, hormonul lactogen.

Adenohipofiza cuprinde cinci tipuri de celule secretorii, celule somatotrope, corticotrope, gonadotrope, tireotrope, lactotrope, fiecare tip secretând un singur hormon.

BOOK CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Funcţia adenohipofizei este reglată de către peptide elaborate în diverse arii ale hipotalamusului. Substanţele eliberate de terminaţiile fibrelor nervoase hipotalamice în capilarele eminenţei mediane sunt transportate prin sistemul vascular portal la hipofiză Hormonii hipotalamici stimulează secreţia tropinelor hipofizare şi sunt denumiţi RH (releasing hormone) sau inhibă eliberarea acestora, sunt RIH (release-inhibiting hormone). Hormonii hipotalamici sunt peptide, cuprind între 3 resturi aminoacidice (THR) şi 44 resturi (GnRH) (Tabelul XII.6).

Tabelul XII.6.

Hormonii hipotalamici

Hormon	*Secvenţa aminoacidică*
TRH (hormon eliberator al tireotropinei)	piro-Glu-His-ProNH$_2$
Somatostatină-14 (GH-RIH)	S———————————————————S Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-NH2
Gn-RH (hormon eliberator al Gn)	piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH$_2$
CRH (hormon eliberator al ACTH)	Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Glu-Glu-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu Asp-Ile-Ala-NH$_2$
GH-RH(hormon eliberator al GH)	Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH$_2$

Eliberarea hormonilor hipotalamici şi a tropinelor hipofizare este reglată prin mecanism feedback de către concentraţia plasmatică a hormonilor periferici. Un nivel mai scăzut al hormonului circulant, în conjuncţie cu diverşi stimuli nervoşi, constituie semnalul pentru secreţia unui hormon hipotalamic eliberator (RH). Ajuns la hipofiză prin sistemul vascular port, declanşează secreţia unei tropine specifice care acţionând la nivelul unei glande endocrine periferice ţintă determină modificări trofice şi secretorii care au ca rezultat eliberarea în circulaţie a hormonului. Hormonul periferic, într-o concentraţie mai mare, redresează un parametru biologic specific şi în acelaşi timp, inhibă secreţia de tropină hipofizară ca şi secreţia de RH (eventual stimulează eliberarea unui hormon hipotalamic inhibitor, RIH). În unele cazuri funcţionează şi o buclă scurtă inhibitorie prin circulaţia sanguină retrogradă între hipofiză şi hipotalamus.

Hormonii adenohipofizari sunt de natură peptidică şi după înrudirile structurale, evolutive şi funcţionale sunt împărţiţi în trei grupe:

1) grupa corticotropinei, cuprinde peptidele derivate dintr-un precursor comun, pro-opio-melanocortină (grupa POMC);

2) grupa hormonilor somatomamotropi;

3) grupa hormonilor glicoproteici.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Peptide derivate din pro-opiomelanocortină (POMC)

POMC este un polipeptid cuprinzând aproximativ 250 resturi aminoacidice prin a cărui prelucrare posttraducţională se obţin diverse fragmente cu funcţii hormonale, neutrotransmiţători, neuromodulatori. POMC este sintetizată în lobul anterior al hipofizei (în celule corticotrope), în lobul intermediar (la acele specii la care acest lob este dezvoltat), în creier, placentă, testicul.,

Prelucrarea POMC şi formarea peptidelor active are loc prin scindări la nivelul unor legături peptidice între aminoacizi bazici (lizina, arginina), recunoscute de o endopeptidază celulară (cu specificitate asemnănătoare cu a tripsinei). Fragmentele peptidice sunt în continuare scurtate de la capete sub acţiunea unor exopeptidaze (de regulă carboxipeptidaze). Prin alte transformări, metilare, acetilare, amidare etc., activitatea biologică a peptidelor este potenţată sau, din contră, diminuată sau anulată.

Prin prelucrarea primară şi secundară a POMC rezultă mai multe peptide active (Fig. XII.39). Există diferenţe între prelucrarea POMC în lobul anterior, în pars intermedia, în ţesuturile extrahipofizare şi diferenţe interspecii. La om, prin prelucrarea POMC în lobul anterior hipofizar se obţin un fragment N-terminal, un peptid de legătură, ACTH şi β - LPH

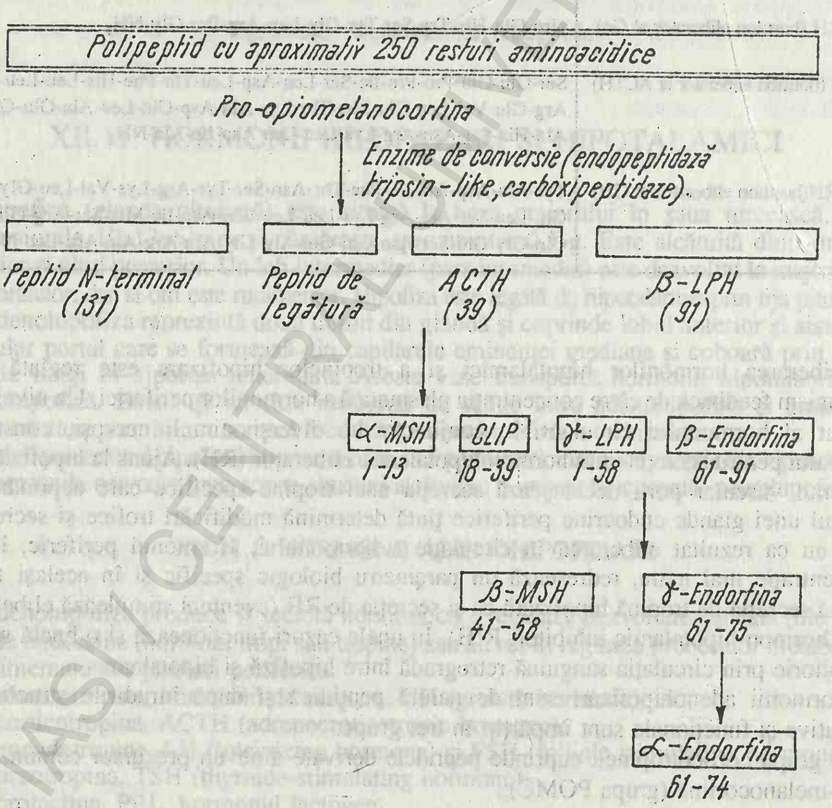


Fig. XII.39 - Peptide active obţinute prin procesarea proopiomelanocortinei (POMC) MSH = Hormon stimulator al melanocitelor; ACTH = Hormon adrenocorticotrop; LPH = Hormon lipotrop, lipotropină; Clip = Corticotropinlike intermediate lobe peptide.

(hormon lipotrop). β -LPH este secretat ca atare sau este scindat mai departe în γ -LPH şi β -endorfină. Există dovezi că β -endorfina în lobul anterior hipofizar uman este inactivată prin acetilare. β - Endorfina activă rezultă prin prelucrarea POMC în hipotalamus.

La speciile cu un lob intermediar dezvoltat, prin prelucrarea POMC se formează melantropina, MSH (hormonul stimulator al melanocitelor). α - MSH se formează din ACTH, β -MSH din γ -LPH; fragmentul N-terminal formează γ -MSH. Melanotropina are rolul de a dispersa pigmenţii melaninici în celulele melanofore determinând închiderea culorii pielii. Această funcţie este amplu dezvoltată la amfibieni la care schimbarea culorii tegumentului este un mecanism de apărare, MSH mai are roluri, puţin înţelese, în comportament, în funcţia testiculară.

La om, funcţiile MSH aparţin probabil ACTH şi γ -LPH care cuprind secvenţele aminoacidice corespunzătoare. $ACTH_{1-13}$ corespunde α -MSH şi γ - LPH_{41-58} corespunde β -MSH.

Peptidul N-terminal, secretat împreună cu ACTH, ar avea rol în potenţarea activităţii steroidogenetice a ACTH.

Principalul peptid care se formează în adenohipofiza umană prin prelucrarea POMC este corticotropina (ACTH).

Corticotropina umană (ACTH) este un polipeptid cu 39 resturi aminoacidice (Fig. XII.40). Segmentul N-terminal 1-24 posedă activitatea biologică completă şi este invariabil la multe specii.

Corticotropina controlează dezvoltarea cortexului adrenalelor şi sinteza de steroizi. Activează etapa iniţială a steroidogenezei, transformarea colesterol ---→ pregnenolonă, sub stimulare corticotropă creşte sinteza de glucocorticoizi şi de androgeni corticali.

Sinteza şi secreţia de corticotropină sunt reglate prin hormonul hipotalmic eliberator, CRH, care controlează sinteza POMC. Creşterea concentraţiei plasmatice a cortisolului inhibă atât secreţia de CRH cât şi de ACTH.

Secreţia de ACTH prezintă un ritm diurn, similar cu acela al cortisolemiei, dar întârziat cu aproximativ 1 oră. Secreţia maximă de ACTH are loc între 1 şi 4 noaptea.

În condiţiile de stress, eliberarea de ACTH este mediată de sistemul nervos central. ACTH stimulând activitatea adrenalelor determină creşterea cortisolemiei cu efecte metabolice adaptative.

ACTH exercită acţiuni reglatoare şi în ţesuturi extrasuprarenaliene ca promovarea lipolizei în ţesutul adipos, facilitarea captării glucozei şi aminoacizilor în muşchi, stimularea secreţiei de insulină de către celulele β din pancreas. Aceste efecte devin pregnante în stări patologice când creşte producţia de ACTH.

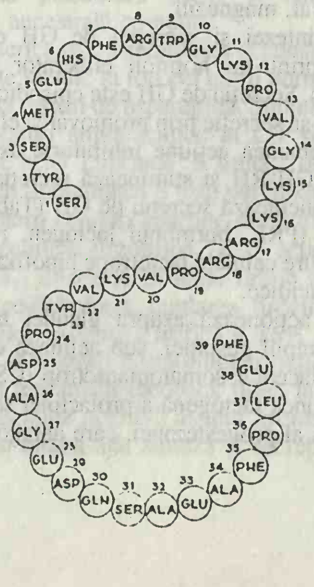


Fig. XII.40 - Structura ACTH
(cortcotropină)

Grupul hormonilor somatomamotropi

Acest grup cuprinde hormonul de creştere (GH = growth hormone, somatotropina) şi prolactina (PRL sau hormonul lactogen). Un peptid cu structură asemănătoare acestora este elaborat de placentă, somatomamotropina corionică (CS sau hormon lactogen placentar). Aceşti hormoni polipeptidici cuprind 191 resturi aminoacidice (GH şi CS) şi, respectiv, 199 (PRL). Între GH şi CS există omologie structurală în proporţie de 85% iar între PRL şi GH omologia este de numai 13%.

Hormonul de creştere (GH, somatotropina) este sintetizat în celulele somatotrope, cel mai abundent tip de celule adenohipofizare (35 - 40% din glandă).

Hormonul uman (diferit de cel al altor mamifere) este alcătuit dintr-un singur lanţ polipeptidic cu 191 resturi aminoacidice.

Hormonul de creştere exercită două serii de acţiuni:

- controlează creşterea postnatală, dezvoltarea scheletului, a ţesuturilor moi;
- reglează metabolismul general - glucidic, lipidic, proteic, mineral la nivelul ţesuturilor periferice.

Acţiunea de hormon de creştere este indirectă, este mediată de IGF-I şi IGF-II (IGF = insulin-like growth factor) sau somatomedine. Hormonul de creştere controlează sinteza şi eliberarea acestor factori de către ficat şi alte ţesuturi.

Acţiunile metabolice ale GH converg spre facilitarea proceselor anabolice, biosintetice, prin asigurarea materiilor prime şi a surselor energetice.

GH stimulează sinteza proteinelor prin mecanisme multiple: facilitează transportul intracelular de aminoacizi, creşte sinteza de ARN_m, accelerează încorporarea aminoacizilor în proteine, scade metabolismul proteinelor şi al aminoacizilor. Sub acţiunea GH bilanţul azotat al organismului se pozitivează.

La nivelul metabolismului glucidic, efectele GH sunt antagonice cu ale insulinei: scade utilizarea periferică a glucozei, inhibă glicoliza şi stimulează gluconeogeneza hepatică. În cazul hiperproducţiei de GH apar semnele caracteristice hipoinsulinismului, hiperglicemia şi cetonemia.

Metabolismul lipidic, sub acţiunea GH, este deplasat spre mobilizarea trigliceridelor de rezervă, creşte lipoliza şi nivelul acizilor graşi liberi din sânge. În ţesuturile periferice este stimulată arderea acizilor graşi.

Hormonul de creştere influenţează metabolismul mineral prin creşterea retenţiei ionilor de calciu, fosfat, magneziu.

Reglarea sintezei şi secreţiei de GH este controlată pozitiv şi negativ de către hipotalamus printr-un hormon eliberator (GH-RH) şi altul inhibitor (GH-RIH sau somatostatină). Secreţia de GH este episodică şi pulsatilă. Hormonul de creştere circulant inhibă propria sa secreţie prin promovarea eliberării somatostatinei. IGF-I (somatomedina C) are de asemenea acţiune inhibitorie asupra secreţiei de GH prin aceea că inhibă eliberarea de GH-RH şi stimulează secreţia de somatostatină. Alţi factori umorali sau neurogeni influenţează secreţia de GH (Tabelul XII.7).

Prolactina (PRL, hormonul lactogen, mamotropină) este sintetizată, depozitată şi secretată de către celulele lactotrope hipofizare (10-25% din total). Este o proteină cu 199 resturi aminoacidice.

Prolactina acţionează asupra glandei mamare controlând iniţierea şi întreţinerea lactaţiei. În timpul gestaţiei, sub acţiunea combinată a estrogenilor, progesteronei şi a hormonului placentar somatomamotrop (CS) are loc dezvoltarea sânilor şi a aparatului secretor. Acţiunea lactogenă a prolactinei se manifestă după naştere, când scade nivelul estrogenilor şi al progesteronei, care antagonizează efectul prolactinei.

Secreţia de prolactină este controlată negativ de către hipotalamus. Un factor inhibitor este dopamina care eliberată de terminaţiile nervoase dopaminergice ajunge la adenohipofiză prin sistemul circulator portal hipotalamo-hipofizar. Dopamina inhibă sinteza prolactinei ca şi eliberarea sa. Un alt factor cu acţiune inhibitoare asupra secreţiei de prolactină este un neuropeptid (56 aminoacizi) cunoscut ca GnRH-associated peptide (GAP). Acest peptid are şi acţiune de hormon eliberator al gonadotropinelor hipofizare (GnRH).

Tabelul XII.7.

Factori care influenţează secreţia de GH

Factori	*Secreţia de GH*	
	Crescută	*Diminuată*
Neurali	Somnul Stress (traumatisme, emoţii, infecţii) Agonişti α - adrenergici Antagonişti β - adrenergici L - Dopa	Absenţa emoţiilor Agonişti β -adrenergice Antagonişti α -adrenergici
Metabolici	Hipoglicemie (foame) Aminoacizii plasmatici Uremie crescută	Hiperglicemie Nivel crescut de acizi graşi liberi în sânge Obezitate
Hormonali	GH - RH Nivel scăzut de IGF-I Estrogeni Glucagon Vasopresină	Somatostatina (GH-RIH) Hipotiroidism

Hormonii hipofizari glicoproteici

Din acest grup fac parte gonadotropinele (Gn), FSH şi LH, şi tireotropina (TSH). O structură analoagă prezintă gonadotropina placentară (hCG = human choronic gonadotropin). Aceşti hormoni au o origine ancestrală comună.

Hormonii glicoproteici au o structură dimerică $\alpha\beta$. Subunitatea α constă dintr-un lanţ polipeptidic cu 96 resturi aminoacidice şi este identic la toţi cei patru hormoni. Cuprinde două unităţi oligozaharidice legate covalent la resturi de asparagină. Subunitatea β, diferă de la un hormon la altul, cuprinde 115 resturi aminoacidice la LH şi FSH, 110 la tireotropină şi 147 la hCG. Lanţul β din hCG cuprinde 5 unităţi oligozaharidice, subunitatea β din FSH, LH şi TSH câte două. Subunitatea β este purtătoare de activitate biologică, dar capacitatea de legare la receptorii celulari aparţine dimerului.

Tireotropina (TSH), este sintetizată în celulele tireotrope. TSH acţionează asupra glandei tiroide stimulând sinteza de T_4 şi T_3. Intervine în toate fazele acestui proces, captarea şi activarea iodului, iodurarea tireoglobulinei, cuplarea tirozinelor iodurate, hidroliza tireoglobulinei şi secreţia hormonilor. Acţiunea trofică a TSH asupra tiroidei este un efect tardiv şi este datorat eliberării şi acţiunii hormonilor tiroidieni însăşi.

Reglarea eliberării TSH are loc printr-un mecanism feedback tipic, la care participă hormonul hipotalamic eliberator (TRH) cu acţiune pozitivă asupra tiroidei şi eliberarea în circulaţie de T_4 şi T_3. Hormonii tiroidieni inhibă atât sinteza şi secreţia de TRH cât

şi pe cea a TSH. Această ultimă acţiune pare a fi mediată de somatostatină. T_4 şi T_3 stimulează sinteza de somatostatină care, la rândul ei, inhibă eliberarea de TSH.

TSH se formează şi în alte regiuni ale creierului având rolul de neurotransmiţător.

Gonadotropinele. LH (hormonul luteinizant) şi FSH (hormonul stimulator al foliculilor) controlează funcţiile glandelor sexuale. Sunt secretate de celulele gonadotrope (5-9% din totalul celulelor adenohipofizei). Gonadotropina corionică (hCG) este produsă de placentă şi prin acţiuni se aseamănă cu LH.

FSH la femeie promovează dezvoltarea foliculilor ovarieni, prepară foliculul pentru ovulaţie şi mediază eliberarea de estrogeni indusă de LH. La bărbat, FSH acţionează asupra celulelor Sertoli din testicul şi induce sinteza proteinei transportoare de testosteronă (ABP = androgen-binding protein) şi promovează spermatogeneza.

LH, la femei promovează sinteza de estrogeni şi de progesteronă, iniţiază ovulaţia. La bărbat, stimulează producţia de testeosteronă de către celulele interstiţiale.

Secreţia de gonadotropine hipofizare este reglată pozitiv printr-un hormon hipotalamic eliberator (GnRH) care stimulează secreţia de LH şi de FSH. Hormonii sexuali circulanţi inhibă atât secreţia de hormon hipotalamic eliberator cât şi secreţia tropinelor hipofizare.

XII.11.2. HORMONII NEUROHIPOFIZARI

Neurohipofiza elaborează şi secretă doi hormoni, vasopresina sau hormonul antidiuretic (ADH) şi oxitocina. Ambii hormoni sunt nonapeptide, diferind prin două resturi aminoacidice. Vasopresina umană (Arg-vasopresină) este identică cu cea a altor specii. Vasopresina de la porc cuprinde în locul restului Arg un rest Lys (Lys-vasopresina) (Fig. XII.41).

Vasopresina (Arg-vasopresina), are o masă de 1084 daltoni şi caracter bazic pronunţat (pI = 10,9). Oxitocina (masa de 1007 daltoni) este mai puţin bazică ca urmare a absentei restului Arg sau Lys.

Biosinteză. Hormonii neurohipofizari sunt sintetizaţi în hipotalamus, vasopresina în nucleul supraoptic, oxitocina în nucleul paraventricular, sub forma unor precursori cu moleculă mare. Prin prelucrarea acestor precursori rezultă, pe de o parte vasopresina şi neurofizina II, şi pe de

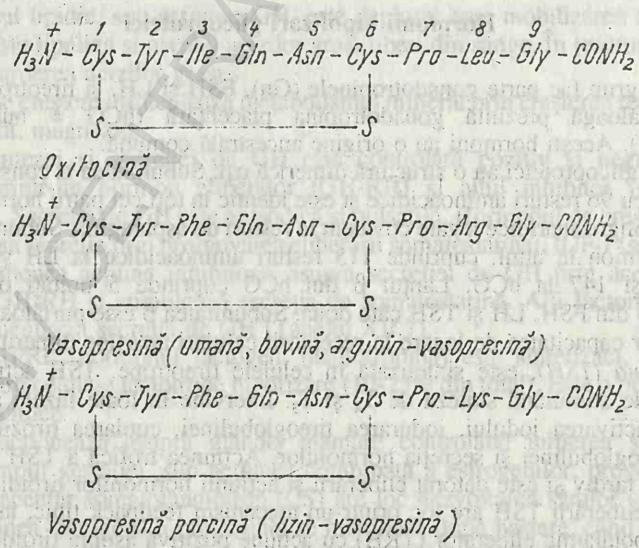


Fig. XII.41 - Structurile oxitocinei şi vasopresinei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

altă parte, oxitocina şi neurofizina I. Hormonul împreună cu neurofizina specifică sunt transportaţi în lungul axonilor şi depozitaţi în terminaţiile nervoase din hipofiza posterioară. Exocitoza granulelor eliberează în circulaţia sanguină pe lângă nonapeptid şi neurofizina corespunzătoare. Eliberarea oxitocinei şi a vasopresinei este declanşată de stimuli diferiţi.

Viaţa biologică a horminilor neurohipofizari este scurtă ($t_{1/2}$ de 2-4 minute), sunt rapid catabolizaţi în ţesuturi periferice. O parte din vasopresină este eliminată ca atare prin urină.

Vasopresina participă la homeostazia osmolalităţii şi a volumului fluidului extracelular prin reglarea eliminării renale de apă. În prezenţa vasopresinei debitul urinar scade de la 15-20 ml/min, la aproximativ 1 ml/min şi osmolalitatea urinii creşte de la 300 mosmoli/kg la 600-800 mosmoli/kg.

Vasopresina acţionează asupra epiteliului tubilor contorţi distali şi colectori crescând fluxul transcelular de apă din lumen în fluidul extracelular. Hormonul măreşte permeabilitatea pentru apă a membranei luminale a epiteliului tubular, probabil prin creşterea numărului de canale pentru apă.

Vasopresina acţionează prin creşterea concentraţiei AMP_c şi activarea proteinkinazei A, dar nu este încă identificat efectorul ultim al acestor acţiuni.

Receptorii pentru vasopresină au fost identificaţi şi în alte tesuturi şi ocuparea acestora determină efecte mediate de AMP_c, cu glicogenoliză în ficat, eliberare de ACTH în adenohipofiză, constricţia arteriolelor (acţiune vasopresoare). Nu este încă lămurit rolul fiziologic al acestor acţiuni.

Stimulii fiziologici pentru eliberarea vasopresinei este creşterea osmolalităţii plasmei (hemoconcentrare) şi scăderea volumului fluidului extracelular sesizate de osmoreceptori situaţi în hipotalamus şi de baroreceptori din sistemul circulator. Vasopresina prin retenţie de apă restabileşte concentraţia şi volumul sângelui.

Oxitocina exercită acţiune contractilă asupra muşchiulaturii netede din uter. Are rol în iniţierea travaliului la femeia gestantă la termen şi expulzarea fătului. Receptivitatea uterului pentru oxitocină este reglată de hormonii sexuali, estrogenii măresc iar progesterona scade receptivitatea.

O altă acţiunea a oxitocinei, cea mai importantă fiziologic, este contracţia celulelor mioepiteliale ce înconjoară alveolele mamare şi ejecţia laptelui.

Eliberarea de oxitocină este determinată prin mecanisme neuroumorale de impulsuri ce pornesc de la nivelul glandei mamare sau al uterului.

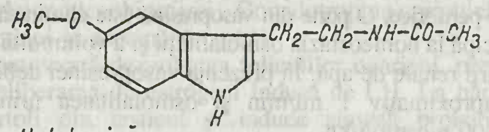
XII.12. EPIFIZA (GLANDA PINEALĂ)

Epifiza este o structură conică situată în partea superoposterioară a peretelui celui de al treilea ventricul. Este alcătuită din celule epiteliale (pinealocite) grupate în jurul unei cavităţi centrale care la adult, în genere, se calcifiază. Epifiza la mamifere, spre deosebire de vertebratele inferioare, nu are conexiuni directe cu creierul şi cu ochii. Pineala primeşte impulsuri nervoase (via ganglionul cervical superior) privind iluminarea şi întunericul independent de percepţia conştientă de lumină.

La amfibiene, pineala are roluri antagonice cu ale melanotropinei (MSH), determină contracţia celulelor melanofore şi deschiderea culorii tegumentului. La mamifere se admite că are rol în reglarea bioritmurilor endocrine circadiene şi sezoniere, în controlul funcţiilor sexuale (inhibă eliberarea de gonadotropine), a ritmurilor sezoniere de reproducere la mamiferele inferioare.

În epifiză au fost identificate numeroase substanțe bioactive (noradrenalină, melatonină, serotonină, histamină, dopamină, peptide ca THR, LH-RH, vasotocină, analog al vasopresinei și oxitocină) alături de proteina specifică, epifizina.

Melatonina (O-metil-N-acetil-serotonina) este produsul specific al epifizei:



Sinteza melatoninei pornește de la aminoacidul triptofan (Fig. XII.42). Reacția limitantă de viteză este reacția (3) catalizată de serotonin-N-acetil transferaza. Secreția de melatonină este maximă noaptea și activitatea acetiltransferazei variază în același mod. Conținutul epifizei în această enzimă crește la trecerea de la iluminare la întuneric, de până la 100 de ori. Totuși, în afară de ciclul lumină-întuneric eliberarea de melatonină este influențată și de alți factori, somn, postură, dietă, activitate. Nu s-a stabilit rolul celorlalți produși ai pinealei.

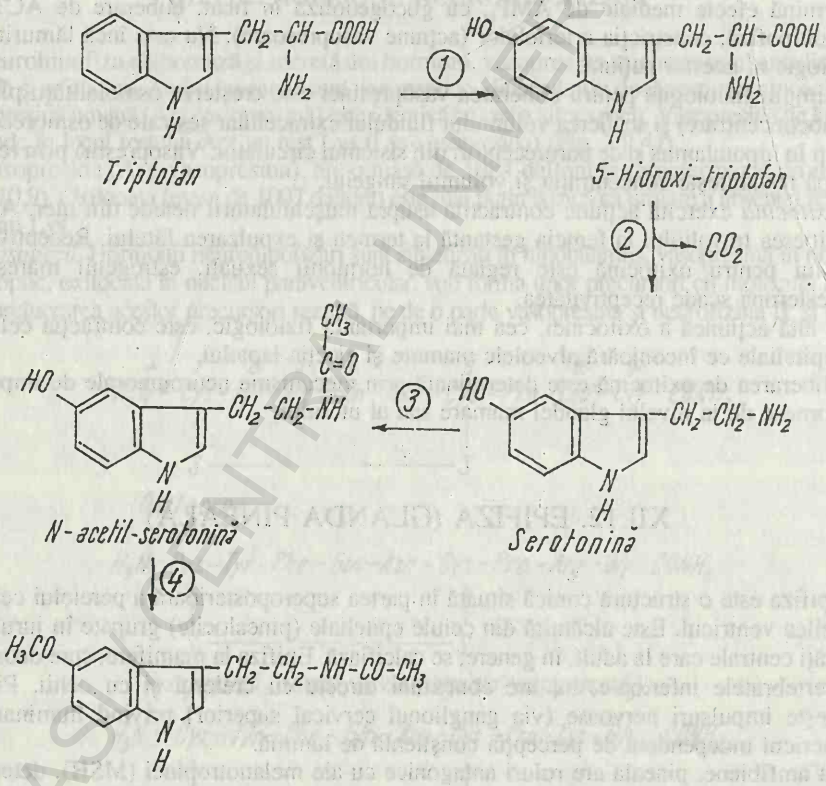


Fig. XII.42 Biosinteza melatoninei
1) Triptofan hidroxilază; 2) Aminoacid decarboxilază;
3) Serotonin-N-acetil transferază; 4) Hidroxiindol-O-metil transferază.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XII.13. ENDORFINE

În creier au fost identificate numeroase peptide cu roluri reglatoare asupra funcţiei nervoase superioare. Unele dintre aceste substanţe sunt prezente şi în alte regiuni ale corpului, îndeplinind funcţii diferite de acelea pe care le au în creier. În Tabelul XII.8 sunt prezentaţi câţiva din aceşti compuşi (neuropeptide).

Tabelul XII 8

Structurile unor neuropeptide

Somatostatină 14	S—S (punte disulfidică între Cys-3 și Cys-14) Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
Somatostatină 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly- S—S -Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
VIP (vasoactive intestinal peptide)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Glu-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH_2
NPY (neuropeptidul Y)	Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Tyr-Arg-Glu-Arg-Tyr-NH_2
Substanţa P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2
Colecistokinină (CCK)	Asp-Tyr(SO_3^-)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
DSIP (delta sleep inducing peptide)	Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu
Met-Encefalină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu-Encefalină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
α - Endorfină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Glu-Thr-Pro-Leu-Val-Thr

Hormonii hipotalamici (RH şi RIH) şi hormonii neurohipofizari au fost trataţi anterior.

Peptidele din creier au roluri deosebite în procese homeostazice, în comportament, memorie, învăţare, durere, somn etc.

Endorfinele sunt neuropeptide cu acţiuni asemănătoare cu ale morfinei, principiul activ extras din opiu, substanţă analgezică şi euforică.

Plecându-se de la constatarea că morfina întâlneşte în creier receptori cu care interacţionează s-a dedus că aceşti receptori sunt destinaţi unor substanţe endogene. Aceste substanţe au fost descoperite şi denumite endorfine. Iniţial au fost identificate două substanţe morfine-like, pentapeptide, Met-encefalina şi Leu-encefalina (Tabelul XII 8). Ulterior s-au adăugat şi altele, α-, β-, γ-endorfina, dinorfina, α-neo- şi β-neo - endorfina.

Aceste peptide rezultă din prelucrarea unor precursori polipeptidici. Proopiomelancortina (POMC) dă naştere la α-, β-, γ-endorfină şi Met-encefalină (din fragmentul β-LPH) (Fig. XII.43).

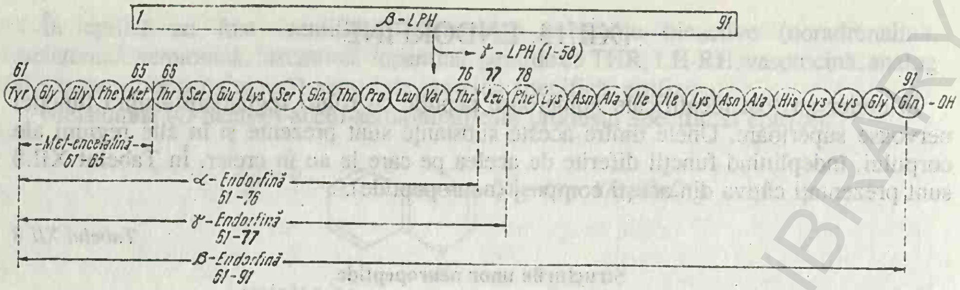


Fig. XII.43 - Formarea endorfinelor şi a Met-encefalinei din β-LPH (polipeptid rezultat prin scindarea POMC)

Un alt precursor, proencefalina A, dă naştere la patru molecule de Met-encefalină şi una de Leu-encefalină. Proencefalina B (pronorfină) formează α-neo, β-neoendorfină şi dinorfină.

Prelucrarea acestor precursori se face diferenţiat în diverse arii ale creierului şi distribuţia endorfinelor este diferită în diverşi neuroni.

XII.14. FACTORI DE CREŞTERE

Creşterea fizică a organismului este reglată de hormoni clasici ca somatotropina hipofizară (GH), hormonii tiroidieni, corticosteroizii şi alţii. În afara controlului global al creşterii organismului, la nivel celular acţionează numeroşi factori care reglează diverse momente din viaţa celulelor (proliferare, dezvoltare, diferenţiere). Aceşti factori au fost denumiţi factori de creştere (growth factor, GF). Factorii de creştere acţionează prin mecanismele generale ale hormonilor clasici, sunt recunoscuţi de receptori membranari şi semnalul extern este prelucrat prin aceleaşi mecanisme transductoare. Sistemele efectoare celulare sunt de asemenea, comune cu cele ale altor mesageri extracelulari.

Existenţa unor factori exogeni necesari creşterii celulare a reieşit din observaţiile că supravieţuirea şi multiplicarea celulelor în culturi, in vitro, este dependentă de adăugarea la mediile de cultură a unor ingrediente naturale complexe, ca ser sau extract embrionic. Cercetările întreprinse pentru identificarea componenţilor activi ai acestor ingrediente au dus la descoperirea unor peptide necesare bunei dezvoltări a celulelor denumite factori de creştere. Aceşti factori acţionează şi in vivo, ei reglează diferenţierile celulare în viaţa embrionară, creşterea, dezvoltarea, vindecarea rănilor.

Numărul factorilor de creştere descrişi până acum este relativ mare şi mereu se descoperă alţii. Denumirea lor s-a făcut după una sau alta din proprietăţile lor specifice, după tipul celular (ţesut) unde a fost descoperit sau după numele ţesutului asupra căruia s-a presupus că ar acţiona în mod specific. Uneori unui aceluiaşi factor i-au fost atribuite nume diferite, fiind descoperit independent de mai mulţi autori şi în diverse laboratoare. Astfel FGF (Fibroblast growth factor) a fost descris ca adipocyte growth factor, glial growth factor, macrophage growth factor şi multe altele.

Cunoştinţele mai ample privind factorii de creştere au permis gruparea lor în familii după asemănări structurale, după natura tipurilor celulare asupra cărora acţionează şi a modului în care intervin în proliferarea şi diferenţierea celulelor.

Mai departe sunt descrise câteva familii de factori de creştere.

XII.14.1. FAMILIA EGF
(Epidermal growth factor)

Principalii reprezentanţi ai acestei famili sunt EGF (Epidermal growth factor, factorul de creştere a epidermei) şi TGFα (Transforming growth factor α, factorul de transformare α)

EGF a fost izolat iniţial dintr-un extract de glandă salivară de la şoarece şi identificat prin acţiunea sa proliferativă asupra epidermei. Ulterior s-a găsit că EGF este produs de celule de origine diversă şi de la specii diferite. EGF uman a fost identificat cu un peptid izolat anterior din urina femeilor gravide - urogastrona - şi care avea acţiunea protectoare asupra mucoasei gastrice.

EGF este un peptid cu 53 resturi aminoacidice. Este rezultat al prelucrării unui pre-pro-EGF. Gena acestui precursor este situată în vecinătatea imediată a genei interleukinei-2.

Receptorul EGF este o proteină membranară glicozilată, cu masă de 160-190 kD. Receptorul activat dezvoltă activitate protein kinazică tirozin-specifică care se manifestă prin autofosforilarea receptorului ca şi asupra unor proteine citosolice.

EGF acţionează ca factor de creştere asupra epiteliilor de origine ectodermală. Prezenţa sa în concentraţii ridicate în lichidul amniotic susţine rolurile EGF în proliferarea şi diferenţierea celulară în viaţa fetală. EGF este prezent, de asemenea într-o concentraţie mai mare, în colostru având roluri în maturarea epiteliului digestiv în viaţa neonatală.

TGFα (Transforming growth factor) este un peptid cu 50 resturi aminoacidice, omolog în proporţie de 35% cu EGF, TGFα utilizează acelaşi receptor ca şi EGF. TGFα a fost identificat ca produs al unor celule tumorale, dar apoi s-a stabilit că el este sintetizat şi de către celule normale (sistem nervos, piele). Are acţiuni similare cu ale EGF. Alături de acesta din urmă, TGFα ar avea roluri importante în dezvoltarea fetală. Este de remarcat că TGFα a fost găsit într-o cantitate relativ ridicată în pielea pacienţilor cu psoriasis.

XII.14.2. FAMILIA FGF
(Fibroblast growth factor, factor de creştere a fibroblastilor)

Termenul de FGF include un număr de peptide înrudite, expresie a cel puţin 7 gene. Formele majore corespund unei proteine de 13,4 kD cu caracter bazic (pI 9,6) şi alteia cu caracter acid (pI 4,5). Forma bazică este produsă de multe ţesuturi de origine mesodermală, pe când FGF acid se află numai în ţesutul nervos şi retină.

FGF acţionează ca factor de creştere asupra multor linii celulare. FGF a fost descris cu nume diferite până a fost stabilită identitatea presupuşilor factori. FGF bazic este identic cu Adipocyte growth factor, Heparin-binding growth factor, Macrophage growth factor, Tumor angiogenesis factor, Prostatic growth factor şi FGF acid cu Endothelial growth factor I, Retina-derived growth factor.

XII.14.3. FAMILIA PDGF
(Platelet derived growth factor, factorul de creştere eliberat de plachete)

PDGF a fost descoperit în cadrul studiilor întreprinse pentru a explica de ce serul este mai eficient decât plasma în susţinerea proliferării celulelor în culturi, in vitro. S-a conchis că în cursul coagulării sângelui plachetele eliberează un factor mitogen, PDGF. PDGF este concentrat în granulele alfa şi degranularea eliberează PDGF, care prin rolurile sale stimulatorii asupra proliferării celulelor iniţiază procesele care duc la repararea leziunilor tisulare, la vindecarea rănilor.

PDGF este produs de o varietate mare de celule atât în viaţa embrionară cât şi la adult, având un rol important în reglarea creşterii.

PDGF este o proteină dimerică cu masa de 30 kD. Lanţurile individuale A şi B sunt identice în proporţie de 60%. PDGF dimeric există în trei izoforme, AA, AB şi BB.

Receptorii pentru PDGF (170 kD) sunt prezenţi pe numeroase tipuri celulare, în special de origine mesenchimală. Receptorul este un dimer format din subunităţi α şi β. Cele trei izoforme ale PDGF se leagă cu afinităţi diferite la receptorul dimeric. Acest mod de interacţiune creiază o varietate largă de posibilităţi pentru PDGF de a regla multiplicarea celulelor. Receptorul PDGF activat prezintă activitate protein kinazică specifică pentru resturi de tirozină.

PDGF reglează diviziunile celulare, el pare a fi semnalul pentru ca o celulă să treacă punctul de restricţie, să traverseze faza G_1 a ciclului celular sau să treacă din faza G_0 în faza S, de sinteză a ADN, care precede mitoza.

PDGF eliberat de plachete în cazul unor leziuni, are roluri importante în vindecarea rănilor. În plus, PDGF este şi un puternic agent chemotactic pentru macrofage. Fibroblaştii şi celulele endoteliale sunt deosebit de sensibile la acţiunile proliferative ale PDGF, multiplicarea acestor celule fiind esenţială pentru vindecarea plăgilor.

PDGF are un rol important şi în patofiziologia plăcilor ateromatoase. Leziunile suferite de intima vaselor determină agregare plachetară, degranulare şi eliberare de PDGF. Prin rolurile sale chemotactice şi proliferative asupra celulelor musculare netede, PDGF contribuie la iniţierea formării plăcii ateromatoase.

XII.14.4. FAMILIA TGFβ
(Transforming growth factor β)

Această familie cuprinde trei factori, TGF β_1, TGF β_2 şi TGF β_3. Toţi sunt dimeri (25 kD) ai unei subunităţi identice.

TGFβ este un factor de creştere bifuncţional, inhibă dar şi stimulează creşterea celulară. Efectul antiproliferativ se manifestă asupra multor tipuri de celule, în deosebi asupra celulelor epiteliale. Efectul stimulator mai tardiv şi probabil indirect, este observat asupra unor celule ca fibroblaşti şi osteoblaşti. Efectul mitogen sau antiproliferativ depinde de tipul celular, de mediul hormonal şi de mulţi alţi factori încă neprecizaţi.

TGFβ are probabil roluri importante în dezvoltarea embrionului, în fazele iniţiale acţionând mitogen, ca în fazele mai târzii să inhibe selectiv proliferarea celulelor.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XII.14.5. FACTORII DE CREŞTERE INSULIN-LIKE (IGF, somatomedine)

Existenţa acestor factori a fost postulată încă din 1957 ca substanţe secundare induse de somatotropina hipofizară (GH) şi care mediază, acţiunile de hormon de creştere ale acesteia.

Există doi IGF, IGF-I (somatomedina C, o somatomedină adevărată) şi IGF-II. IGF-I este un peptid cu 70 resturi aminoacidice (pI 8,1-8,5) şi care prezintă un grad înalt de omologie structurală cu proinsulina. IGF-II, peptid cu 67 resturi aminoacidice, are caracter neutru. Prezintă o oarecare asemănare cu IGF-I şi cu insulina.

Factorii de creştere insulin-like sunt sintetizaţi de diverse ţesuturi, dar ficatul este sediul principal al acestei sinteze. Producţia de IGF în ficat, dar şi în celelalte ţesuturi, este controlată de GH. Sinteza de IGF în anumite ţesuturi se află sub controlul specific al altor semnale, estrogenii controlează sinteza în endometru, ACTH şi angiotensina II în adrenale, gonadotropinele în gonade.

Somatomedinele circulă în plasmă în asociere cu o proteină de legare specifică. IGFBP (IGF - Binding Protein), care are masa de 150 kD. Sinteza şi concentraţia plasmatică a acestei proteine sunt controlate de GH şi de starea de nutriţie a organismului. În foame sau în deficienţa de GH sinteza hepatică de IGFBP este scăzută. De asemenea adolescenţii sau indivizii cu acromegalie au un nivel plasmatic de IGFBP mai ridicat.

Acţiunile celulare ale IGF sunt mediate de două tipuri de receptori. Receptorul pentru IGF-I are o structură tetramerică ($\alpha_2 \beta_2$) şi prezintă un grad mare de omologie structurală cu receptorul insulinei. Acest receptor este prezent în toate ţesuturile şi cu afinitate mai mică leagă şi IGF-II şi insulina. Receptorul IGF-I activat ca şi cel al insulinei, prezintă activitate protein kinazică, tirozin-specifică.

Receptorul IGF-II este format dintr-un singur lanţ polipeptidic (270 kD). Receptorul nu dezvoltă activitate protein kinazică, însuşire întâlnită la mulţi receptori ai factorilor mitogeni. Receptorul IGF-II leagă cu afinitate mică şi IGF-I, dar nu leagă deloc insulina.

Receptorul IGF-II este identic cu receptorul de legare a unor proteine glicozilate. Aceste proteine se fixează pe receptor prin resturi de manoză-6-fosfat (receptor MGP). Situsurile de legare pe receptor a IGF-II şi a proteinelor manozilate sunt distincte. Prin însuşirea şi de receptor MGP, receptorul IGF-II ar avea rolul de transportor transcelular al hormonului. Acţiunile in vivo ale IGF-II sunt rezultatul legării sale atât la receptorul IGF-I cât şi la cel specific pentru IGF-II.

Distribuţia ubicuitară a receptorilor IGF şi prezenţa lor din viaţa embrionară şi fetală până la bătrâneţe, pledează pentru roluri importante în creştere şi dezvoltare. De asemenea, ei intervin în reglarea răspunsurilor tisulare la boli şi injurii. Somatomedinele acţionează uneori ca factori mitogeni, alteori stimulează diferenţierea celulară şi sinteza unor componenţi specifici.

*

* *

Pe lângă factorii de creştere care stimulează proliferarea unei game largi de tipuri celulare, alţii reglează funcţii înalt specializate ale celulelor diferenţiate (NGF) sau sunt factori care participă la formarea diverselor populaţii de celule sanguine (hemopoeză) din celule primitive din măduvă sau organe limfoide. Unii factori hemopoetici sunt multipotenţi, ei stimulează proliferarea şi dezvoltarea mai multor populaţii celulare (IL-3) sau sunt factori de creştere pentru o singură linie celulară (eritropoetină).

XII.14.6. NGF
(Nerve growth factor, factorul de creştere a nervilor)

NGF este o proteină hexamerică (140 kD) alcătuită din subunităţi α, β şi γ. Subunitatea β posedă activitatea biologică şi prezintă 25% omologie structurală cu lanţurile A şi B ale insulinei. Efectul principal al NGF este acela de a promova supravieţuirea, diferenţierea şi creşterea terminaţiilor nervoase axonale. Neuronii nu se multiplică, NGF nu are acţiune mitogenă pentru sistemul nervos matur, dar acţionează în acest sens pentru precursorii ţesutului nervos. NGF accelerează diferenţierea celulelor primordiale în neuroni simpatici şi senzoriali. În alte ţesuturi, gradientul chemotactic al NGF determină inervarea selectivă a acestora.

În afara rolurilor specifice asupra sistemului nervos, NGF intervine şi în răspunsurile inflamatorii şi imune, exercită acţiuni chemotactice asupra leucocitelor neutrofile.

XII.14.7. FAMILIA CSF
(Colony - stimulating factor)

Această familie cuprinde factori de creştere care controlează proliferarea celulelor albe sanguine. Denumirea de factor care stimulează formarea de colonii provine de la tehnicile experimentale care au dus la identificarea lor, tehnici bazate pe formarea de colonii pe agar după însămânţare cu măduvă osoasă. Factorii din familia CSF determină diferenţierea şi proliferarea celulelor primitive în granulocite, macrofage sau ambele. Sunt descrise patru CSF:

Granulocyte - macrophage - CSF
Granulocyte - CSF
Macrophage - CSF
multi - CSF (identic cu interleukina - 3)

Sursa principală de CSF sunt limfocitele T stimulate cu antigeni, după care urmează monocitele, fibroblaştii şi celulele endoteliale.

XII.14.8. ERITROPOIETINA
(Erythropoesis stimulating factor, ESF)

Este o glicoproteină (39 kD). Eritropoietina induce câteva cicluri proliferative ale celulelor primitive din măduvă ca apoi să stimuleze mitoza la proeritrocite, celule diferenţiate care sintetizează hemoglobina.

Eritropoietina în viaţa fetală este sintetizată de către ficat, ca apoi sinteza sa să fie preluată de rinichi. Stimulii pentru sinteza eritropoietinei sunt hipoventilaţia, anemiile, altitudinea înaltă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XII.14.9. INTERLEUKINELE (IL)

Limfocitele produc numeroase peptide (altele decât anticorpii) care în mod autocrin, paracrin sau la distanţă mare (endocrin) exercită funcţii reglatoare asupra sistemului imun. Aceste peptide au fost descrise ca limfokine (citokine într-un sens mai larg). Cele mai multe dintre limfokine exercită mai mult decât o singură acţiune biologică şi denumirile lor iniţiale, ca factor de diferenţiere a celulelor B, factor de creştere pentru celulele T, au devenit necorespunzătoare. Pentru factorii care reglează creşterea şi diferenţierea limfocitelor s-a propus termenul de interleukine. Au fost descrise nouă interleukine (IL-1—IL-9). Acţiunile biologice ale interleukinelor depăşesc adesea cadrul sistemului imun, ele sunt produse şi de alte celule sau au efecte reglatoare asupra unei mari diversităţi de tipuri celulare. Pe de altă parte, unii factori reglatori activi şi asupra limfocitelor şi-au păstrat denumirile cu care au fost descrişi iniţial, CSF, TNF, interferoni, cu toate că prin mod de producere şi acţiuni şi ei aparţin familiei interleukinelor.

Interleukina-1 (IL-1). Peptid care prezintă două izoforme, α (159 resturi aminoacidice) şi β (153 resturi).

Interleukina-1 este produsă de multe tipuri celulare, producătorii principali in vivo sunt monocitele/macrofagele.

Interleukina-1 exercită un spectru larg de acţiuni stimulatoare asupra celulelor imune şi asupra unor celule din afara sistemului imun. Interleukina-1 este considerată mediatorul major al unui răspuns inflamator. Determină reacţii inflamatorii imediate, locale (infiltraţii, edem) şi răspunsuri sistemice ca febră, răspunsul de fază acută al ficatului. Acţiunile in vivo ale interleukinei-1 sunt foarte complexe prin inducerea de mediatori secundari, PDGF, IL-6, TNF, CSF.

Interleukina-2 (IL-2). Peptid cu masa de 15 kD. Are funcţii imunologice importante în primul rând, iniţiază proliferarea celulelor T activate. Receptorii pentru interleukina-2 sunt absenţi pe celule T în repaos, ei apar la câteva ore după activare prin expansiunea clonală a celulelor. Interleukina-2 stimulează activitatea citolitică a celulelor T citotoxice (killer).

Interleukina-3 (IL-3). peptid cu masa de 23-26 kD. A fost descrisă iniţial ca un CSF (multi-CSF). Stimulează proliferarea şi dezvoltarea celulelor progenitoare eritroide, megakariocite, eozinofile, neutrofile şi macrofage şi susţine reînoirea celulelor primitive multipotente.

Interleukina-4 (IL-4). A fost descrisă iniţial ca Factorul 1 stimulator al limfocitelor B. Acţionează ca factor de creştere pentru celulele B, activate după fixarea antigenului.

De asemenea, stimulează celulele T în repaos, măreşte activitatea citotoxică a celulelor T killer.

Interleukina-6 (IL-6). Peptid cu 184 resturi aminoacidice. Este produsă de o mare varietate de celule şi receptorii pentru interleukină-6 sunt prezenţi pe multe tipuri celulare. În sistemul imun, interleukina-6 induce diferenţierea celulelor B, dar nu şi proliferarea acestora. Asupra unor celule tumorale are acţiune proliferativă. Interleukina-6 eliberată împreună cu interleukina-1 şi TNF (Tumor necrosis factor), prin mecanism endocrin, induc „răspunsul de fază acută" al organismului. Pe lângă febră, acest răspuns se manifestă prin sinteza hepatică a unor proteine (proteine de fază acută). Astfel de proteine sunt, α_1-glicoproteina acidă, componentul C_3 al complementului, haptoglobină, α_2-macroglobulină, α_1-antiprotează.

Interlukina-8 (IL-8). Această leukină a fost descoperită în 1987 ca unul dintre cei mai importanţi mediatori ai răspunsurilor inflamatorii de apărare.

IL-8 este o proteină mică, cu 72 resturi aminoacidice şi o masă de 8383 daltoni. Are caracter bazic (pI = 9,3). Este rezistentă la acţiunea peptidazelor.

IL-8 este produsă de o varietate foarte mare de tipuri celulare, monocite, macrofage, celule epiteliale, fibroblaşti, condrocite, keratinocite, celule epiteliale diverse, astfel încât orice ţesut al organismului este capabil să elibereze această citokină. Stimulii principali pentru eliberare de IL-8 sunt IL-1 şi/sau TNF. Infecţiile, ischemia, traumele de orice fel asociate cu creşteri ale nivelurilor de IL-1 şi TNF determină eliberare de IL-8.

Celulele ţintă pentru IL-8 sunt leucocitele neutrofile. Numărul de receptori pentru IL-8 este de 50.000-70.000 per celulă.

IL-8 induce în neutrofile trei tipuri de răspunsuri:

- activarea sistemului contractil, ceia ce determină aderarea neutrofilelor la celule endoteliale şi migrare;
- exocitoza de granule şi vezicule secretorii cu eliberare de enzime proteolitice (elastază) şi proteine adezive;
- explozia respiratorie, exprimată prin creşterea activităţii NADPH oxidazei şi a producţiei de specii reactive ale oxigenului, cu acţiune destructivă.

IL-8 este la fel de activă asupra neutrofilelor ca şi PAF (factorul activator al plachetelor) şi leucotriena B_4 (LTB_4), dar acţiunea sa chemoatractantă şi de recrutare a neutrofilelor este de mai lungă durată.

TNF (Tumor necrosis factor, factorul necrozant al tumorilor). Este produs în principal de macrofagele activate, dar şi de multe alte celule. Prezintă un spectru larg de acţiuni biologice pe celule ţintă imune şi altele din afara sistemului imun. Există două izoforme, TNFα (cachectină) şi TNFβ (limfotoxină). Cei doi factori utilizează acelaşi receptor şi acţiunile lor sunt asemănătoare.

TNF a fost descoperit prin acţiunea sa de regresie, in vivo, a unor tumori la şoarece. Această acţiune necrozantă a fost demonstrată in vitro şi pe tumori umane. Efectul major, in vivo, al TNF este acela de a media, împreună cu interleukina-1 şi interleukina-6, răspunsurile inflamatorii locale şi sistemice. Efectele locale ale TNF asupra vascularizaţiei poate explica regresia tumorilor in vivo.

XII.14.10. INTERFERONII (INF)

Au fost descoperiţi (1957) prin acţiunea lor antivirală. Sunt proteine induse într-o celulă de către viruşi şi care apoi interferează cu replicarea virală. Spectrul de acţiuni ale interferonilor este însă mult mai larg, au acţiuni antiproliferative şi imunoreglatore. Au fost denumiţi în raport cu tipurile de celule producătoare, interferon α (leucocite), interferon β (fibroblaşti) şi interferon γ (limfocite). Ulterior au fost stabilite multiplicitatea structurală şi specificitatea acţiunilor interferonilor.

Interferonul γ este structural distinct de interferonii α şi β. Primul este produs numai de limfocitele T. El induce sinteza antigenelor de suprafaţă, a complexelor majore de histocompatibilitate (MHC) clasa I şi clasa II. Are activitate antivirală, aceasta pare a fi secundară prin stimularea producţiei de interferoni α şi β. Interferonul γ a fost introdus în terapia unor boli maligne şi autoimune (artrită reumatoidă, scleroză multiplă).

Interferonii α şi β sunt peptide cu aproximativ 170 resturi aminoacidice şi între ei există omologie structurală în proporţie de 34%. Interferonii α şi β utilizează acelaşi receptor, la care se leagă cu afinităţi diferite. Gena pentru receptorul interferonilor α şi β este localizată pe cromosomul 21.

Interferonul α este produs în principal de leucocite, iar cel β de fibroblaşti. Interferonii α şi β au acţiuni antiproliferative, ei contracarează acţiunea mitogenă a altor factori ca CSF-1, PDGF, EGF, IL-2 şi IL-4. Aceşti interferoni stimulează activităţile accesorii ale macrofagelor, producţia de citokine. Acţiunea antivirală a acestor factori este rezultatul degradării ARN viral.

XII.14.11. ONCOGENELE ŞI CONTROLUL CREŞTERII CELULARE

În tumori maligne de la diverse specii, produse de viruşi, au fost identificate gene şi proteine codificate de aceste gene care, într-un fel sau altul, au fost implicate în proliferarea necontrolată a celulelor. Aceste gene au fost denumite oncogene (virale) şi proteinele specificate, oncoproteine.

Din diverşi viruşi sau din tumorile provocate de ei, în special retroviruşi (viruşi cu ARN) dar şi viruşi cu ADN, au fost izolate câteva zeci de oncogene. Aceste gene au fost desemnate prin litera v- (de la virus) urmată de trei litere care, în genere, indică sursa originală a genei. De exemplu, v- src este oncogena virusului producător de sarcom Rous la păsări, v - erb B este oncogena din virusul producător de eritroblastoză la păsări, v - sis este oncogena virusului producător de sarcom la maimuţă. De asemenea, se utilizează expresia oncoproteina src, erb-B, sis.

O legătură între oncoproteine şi factorii de creştere peptidici (GF) a fost stabilită atunci când s-a recunoscut că oncoproteinele sunt înrudite cu constituenţi celulari normali şi că genomul celular gazdă posedă gene identice sau asemănătoare cu genele virusului tumorigen. Retroviruşii (viruşii cu ARN) au abilitatea de a incorpora în genomul propriu fragmente de ADN aparţinând celulei gazdă şi de a trece prin transfecţii o porţiune a propriului lor genom în cel al celulei infectate. Astfel prin trecerea repetată a viruşilor prin celule ei pot dobândi versiuni alterate ale genelor celulei gazdă.

Genele celulare înrudite cu o oncogenă virală au fost denumite C-oncogene sau protooncogene. Protooncogenele specifică proteine care controlează creşterea celulară normală pe când oncogenele determină un pattern de creştere alterat.

Pe lângă oncogenele izolate din tumori produse prin infecţii virale, au fost identificate gene capabile să determine transformarea celulelor şi din tumori de origine nonvirală. De aceea termenul de oncogenă (onc) este atribuit oricărei gene care poate fi răspunzătoare de alterarea modului de creştere normală a celulelor. În genere, oncogenele sunt versiuni alterate ale unor gene celulare normale care prin proteinele pe care le codifică, prin viteza de transcriere şi traducere (viteza de exprimare) sau prin alte căi modifică creşterea celulară (proliferare, diferenţiere, dezvoltare). Au fost descrise mai multe mecanisme prin care o genă celulară normală (protooncogenă) este activată la oncogenă (genă tumorigenă). Unele mecanisme au la bază infecţiile virale, altele nu.

O genă poate fi activată, transcrierea sa şi apoi sinteza proteinei codificate sunt accelerate în urma unei infecţii virale, dacă în genomul celulei normale se inserează un fragment de genă care acţionează ca genă reglatoare (promotor sau enhancer). Produsul

genei normale, cu rol în proliferare, se exprimă exagerat, celula dobândeşte caractere proliferative noi.

Oncogenele pot fi versiuni alterate ale protooncogenelor ca urmare a unor mutaţii suferite în cursul trecerii genei de la celula gazdă la virus. Structura alterată a unei proteine care are roluri reglatoare în proliferare va putea determina malignizarea celulei. Astfel oncogena virală ras specifică o proteină din familia proteinelor G, dar ca urmare a unor mutaţii, capacitatea acestei proteine G de a hidroliza GTP (activitate GTP-azică) este redusă. Proteina G la un semnal mitogen rămâne activată permanent sau un timp mai îndelungat.

Translocările cromosomiale pot aduce în vecinătatea unei gene care specifică factori de control pentru creşterea celulară fragmente de gene care joacă roluri reglatoare (de ex. de enhancer pentru alte gene normale). Astfel într-un cancer al limfocitelor B umane (limfom Burkitt) gena myc, prin translocări între cromosomii 8 şi 14, ajunge sub controlul secvenţei reglatoare „enhancer" al genelor care codifică lanţurile grele (H) ale imunoglobulinelor. Proteina specificată de gena myc este o proteină de legare la ADN, care controlează mitoza. Activarea sistemului imun determină, pe lângă sinteza de anticorpi şi activarea genei myc ceea ce are ca efect transformarea neoplazică a celulei.

Un alt mecanism posibil de transformare a unei protooncogene în oncogenă este amplificarea genică, creşterea numărului de gene în genom, ceea ce va duce la o supraproducţie de proteină reglatoare.

Mai departe sunt descrise succint câteva oncogene (virale sau nonvirale) şi proteinele specificate de aceste gene, modul în care aceste proteine intervin în diviziunea sau diferenţierea celulelor.

Unele oncogene virale codifică proteine identice sau asemănătoare cu factori de creştere:

v-sis specifică o versiune puţin modificată a lanţului B al PDGF;

v-hst, int_2 specifică o proteină foarte asemănătoare cu FGF;

v-vg_1 codifică TGF.

O grupă de oncogene codifică forme modificate ale receptorilor unor factori de creştere:

v-erb B codifică o formă trunchiată a receptorului EGF;

oncogenele erb-A specifică proteine asemănătoare receptorilor pentru hormonii steroidici şi tiroidieni;

oncogenele kit, fms se exprimă ca receptori pentru PDGF şi, respectiv, pentru CSF-1.

Un număr de oncogene, ca src şi abl, codifică proteine membranare care au activitate protein kinazică tirozin specifică sau reglează activitatea acestor kinaze. Produsul oncogenei erb-B, versiune alterată a receptorului EGF, posedă un domeniu protein kinazic cu specificitate pentru resturi de tirozină.

Oncogenele din familia ras codifică proteine cu roluri în etapele postreceptor ale transducţiei semnalelor mitogene. Una dintre aceste proteine este o formă modificată de proteină G, cu activitate auto-GTPazică redusă.

O familie mai numeroasă de oncogene specifică proteine nucleare. Astfel sunt oncogenele myc, fos, jun. Proteinele specificate de genele normale sunt prezente în nucleu şi prin legare la ADN sau alte mecanisme controlează evenimente timpurii ale diviziunii unei celule.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap.XIII. APA, PROCESELE HIDROELECTROLITICE ŞI ECHILIBRUL ACIDO-BAZIC

XIII.1. INTRODUCERE

Apa este principalul constituent al tuturor fiinţelor vii şi împlineşte roluri fundamentale. Într-adevăr, în calitate de constituent al diverselor organisme, ea intră în structura ţesuturilor; o parte este distribuită în spaţiile libere dintre moleculele mari (în genere, proteice) iar o parte este reţinută la suprafaţa macromoleculelor, ca "apă legată". De fapt, însăşi structurile proteinelor, acizilor nucleici şi chiar ale membranelor biologice sunt rezultate din interacţiunea lor cu apa. Pe de altă parte, apa este "mediu intern" în care se distribuie toate substanţele solubile, organice şi anorganice. Datorită acestei însuşiri de solvent, apa transportă în organism atât substanţele nutritive cât şi produsele de excreţie rezultate în urma diverselor metabolisme. De altfel, apa este ea însăşi un metabolit (universal) împlinind fie rol de reactant, fie rol de produs de reacţie în numeroase şi diverse reacţii biochimice fundamentale: digestie, dislocarea majorităţii constituenţilor organismului, reacţii de oxido-reducere, reacţii în urma cărora se eliberează energie (hidroliza ATP-ului şi a altor compuşi macroergici). În sfârşit, apa trebuie considerată şi ca un aliment indispensabil care asigură în organism desfăşurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive.

XIII.2. CONŢINUTUL ŞI REPARTIŢIA APEI ÎN ORGANISM

Deşi apa se află totdeauna în proporţii apreciabile în diverse organisme (peste 60%), gradul de hidratare al lor variază cu natura speciei. De exemplu, organismele unor animale marine, inferioare, sunt aproape tot atât de bogate în apă cât şi mediul în care trăiesc (96,45%).

Conţinutul în apă al vertebratelor este mai redus din cauza scheletului care ocupă o mare parte din corp şi este sărac în apă. În ceea ce priveşte organismul omului, conţinutul în apă se află în raport direct cu suprafaţa corporală. Pe de altă parte, în funcţie de adipozitate, corpul omului conţine între 58 şi 66% apă. La un om adult cu adipozitate normală (22%) organismul cuprinde apă în proporţie de circa 60% din greutate. Bine înţeles, cu cât cantitatea de grăsime este mai redusă cu atât proporţia de apă este mai mare şi invers (Fig. XIII.1). De aceea, oamenii de tip atletic cuprind proporţii mai mari de apă în corp, faţă de celelalte tipuri constituţionale.

O influenţă remarcabilă asupra conţinutului în apă al organismului exercită şi vârsta. Astfel, un embrion de câteva zile conţine 97% apă; fătul de 3 luni conţine 94% iar organismul copilului la naştere cuprinde 66%. Ulterior, apa din organism continuă să scadă încet cu vârsta, menţinându-se între limitele specificate (58-66%). De asemenea, conţinutul în apă al organismului variază şi cu sexul; femeile având un conţinut mai redus de apă (cu 10%), comparativ cu bărbaţii (Fig. XIII.2).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

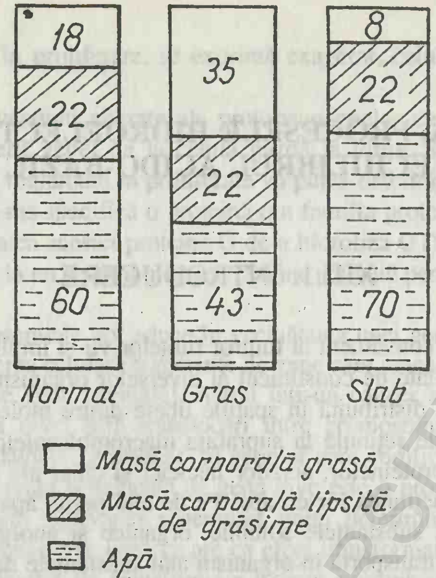


Fig. XIII.1 - Conţinutul procentual în apă al diferitelor tipuri constituţionale

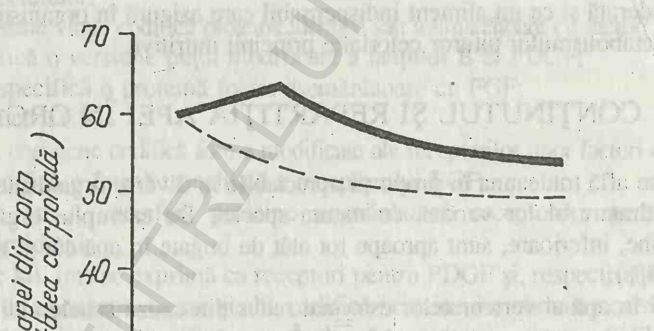


Fig. XIII.2 - Conţinutul în apă al corpului, în funcţie de sex şi vârstă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În organism, apa este repartizată în vasele sangvine şi limfatice, spaţiile intercelulare şi în celule. În afară de localizarea lor, aceste domenii se deosebesc prin compoziţie şi roluri funcţionale. Datorită diferenţierilor existente, ele sunt grupate în două sectoare hidrice: *sectorul intracelular* care reprezintă aproape 50% din greutatea corpului şi *sectorul extracelular* care reprezintă 20% din greutatea corpului (Fig. XIII.3).

Cele două sectoare hidrice (intra şi extracelular) sunt separate prin membrana celulară a cărei *permeabilitate selectivă* determină deplasările apei şi electroliţilor. De fapt, această membrană este impermeabilă pentru cationii Na^+ şi anionii mari şi este permeabilă pentru cationii K^+ şi anionii mici. Ca urmare, compoziţia lichidelor extra şi intracelulare este diferită (Fig. XIII.4).

Din Fig. XIII.4. reiese că, în esenţă, lichidul extracelular este "o soluţie de clorură de sodiu" pe când lichidul intracelular este "o soluţie de fosfaţi şi proteinat de potasiu". Într-adevăr, lichidul intracelular cuprinde o cantitate foarte mică de Cl^- şi practic, deloc Na^+; în schimb, conţine o cantitate foarte mare de ioni K^+ şi fosforici precum şi o proporţie mare de proteine.

Sectorul extracelular este constituit - la rândul său - din două compartimente: *lichidul interstiţial* care ocupă spaţiile intercelulare reprezentând 16% din greutatea corpului şi *plasma sangvină* care reprezintă 4% din greutatea corpului. Aceste două compartimente sunt separate prin pereţii vaselor capilare, permeabili pentru electroliţi şi molecule

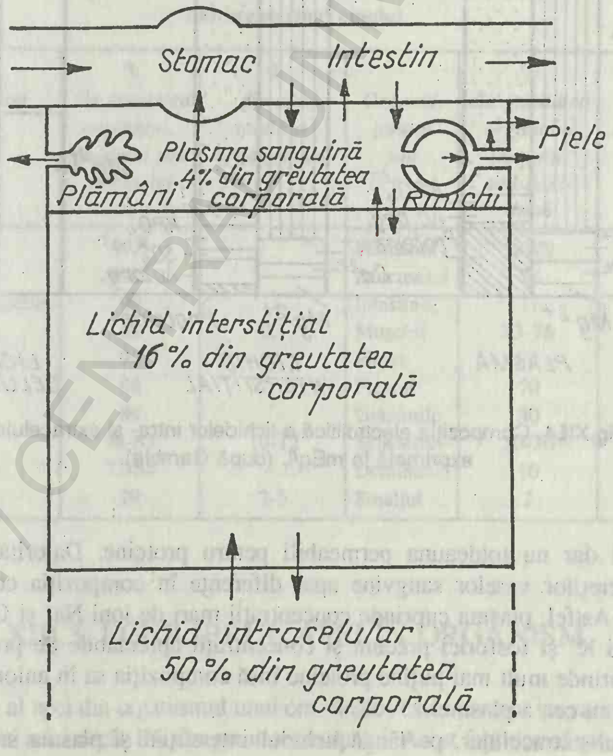


Fig.XIII.3. Repartiţia apei în organism (după Gamble)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

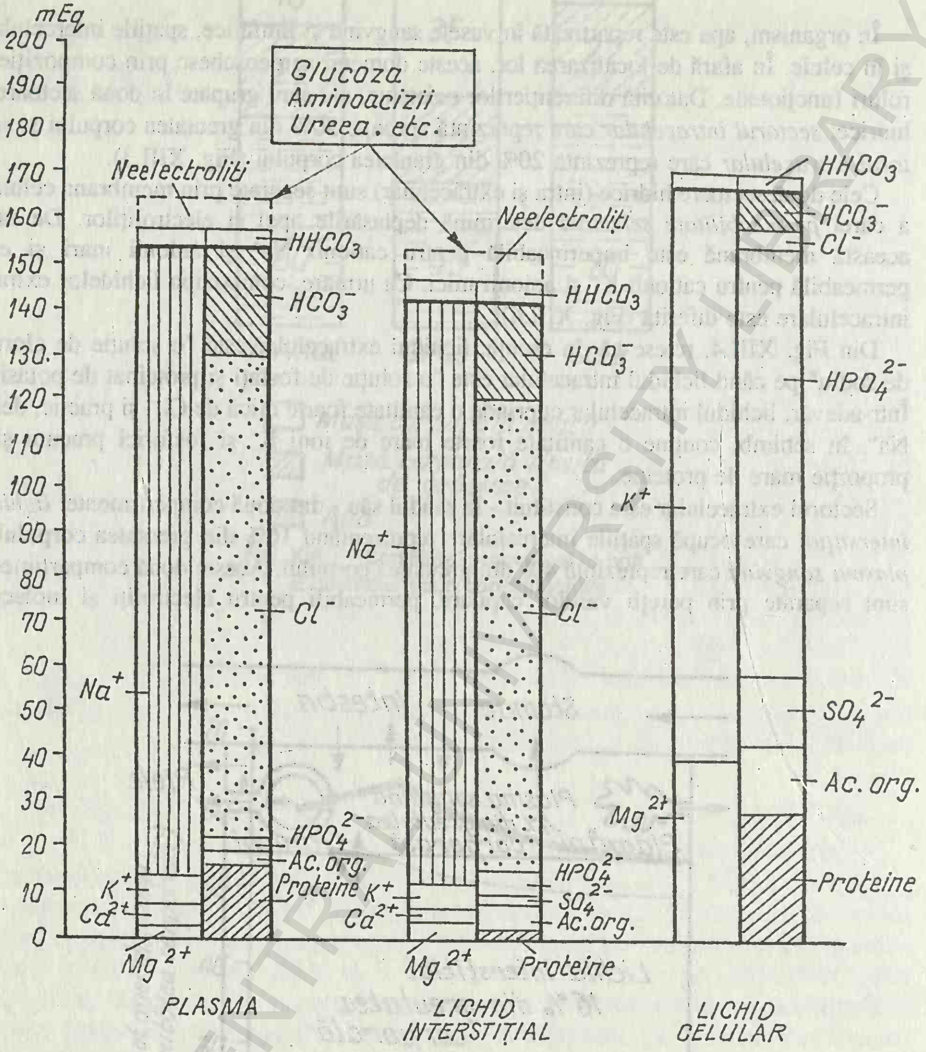


Fig.XII.4. Compoziţia electrolitică a lichidelor intra- şi extracelulare, exprimată în mEq/L (după Gamble).

organice mici dar nu totdeauna permeabili pentru proteine. Datorită permeabilităţii selective a pereţilor vaselor sangvine apar diferenţe în compoziţia compartimentelor extracelulare. Astfel, plasma cuprinde concentraţii mari de ioni Na^+ şi Cl^-, concentraţii reduse de ioni K^+ şi fosforici precum şi concentraţii apreciabile de proteine. Lichidul interstiţial cuprinde mult mai puţine proteine însă compoziţia sa în anioni şi cationi este asemănătoare cu cea a plasmei.

Din sectorul extracelular, pe lângă lichidul interstiţial şi plasma sangvină mai fac parte: limfa (interstiţială şi din vasele limfatice), fluidele din ţesuturile conjunctive,

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fluidele din oase şi fluidele transcelulare. Acestea din urmă sunt reprezentate, în special, de: lichidul din tractul digestiv, urină, bilă şi lichidul cefalorahidian. Fluidele transcelulare se deosebesc de categoriile precedente deoarece împlinesc roluri funcţionale particulare în organism şi nu sunt în aceleaşi relaţii cu lichidul intracelular, cum sunt limfa şi plasma sangvină.

În ceea ce priveşte repartiţia apei din corp în diverse organe sau lichide este de remarcat că ea se face în proporţii foarte variate. Astfel, lichidele - afară de sânge - cuprind între 96 şi 99% apă, ţesuturile cca. 80% (cu limitele 70-83%) şi scheletul 22% (Tabelul XIII.1). Deşi conţinutul în apă al muşchilor nu depăşeşte pe cel al celorlalte ţesuturi moi sau pe cel al sângelui, totuşi - din cauza masei musculare mari din corp - apa cuprinsă în muşchi reprezintă jumătate din conţinutul global al apei din organism.

Determinarea apei totale din organism s-a făcut de mai multă vreme, folosind metode din ce în ce mai precise şi mai simplificate. În schimb, apa cuprinsă în ţesuturi nu s-a putut determina totdeauna (ţesut slab, ţesut gras) cu foarte mare rigurozitate. Actualmente există însă posibilitatea determinării cu precizie a apei din organism - inclusiv, a celei din ţesuturi şi grăsimi - prin utilizarea unui analizor de impedanţă bioelectrică.

Tabelul XIII.1.

Conţinutul în apă al unor organe, ţesuturi şi lichide din organismul omului

Organul, ţesutul sau lichidul	*% din greutatea organului, ţesutului sau lichidului*	*% din apa totală a organismului*	*Organul, ţesutul sau lichidul*	*% din greutatea organului ţesutului sau lichidului*	*% din apa totală a organismului*
Saliva	99,5		Plămânul	78-79	
Transpiraţia	99,5		Pancreasul	78	0,6
Lichidul cefalorahidian	99		Intestinul	77	3
Corpul vitros	98	0,1	Muşchii	73-76	50
Sucul gastric	97		Pielea	72	7-11
Limfa	96		Ficatul	70	3-5
Laptele	89		Grăsimile	30	12
Sângele	78-83	10-12	Scheletul	20-30	10
Rinichiul	77-84		Dentina	10	0,5
Inima	79	2-5	Smalţul	2	0,1

XIII.3. ECHILIBRUL APEI ÎN ORGANISM

Volumul total al apei din organismul unui om sănătos este constant iar variaţiile lui zilnice sunt totdeauna mai mici decât 1% din greutatea corpului. Acest fapt dovedeşte că în organism există, în permanenţă, un echilibru între apa ingerată şi cea excretată (Tabelul XIII.2).

Păstrarea acestui echilibru este cu atât mai remarcabilă cu cât se ştie că ingerările şi excreţiile zilnice variază de la individ la individ iar la aceeaşi persoană, de la o zi la alta. De fapt, constanţa echilibrului se datoreşte bunei funcţionări a sistemului reglator din hipotalamus precum şi activităţilor renală şi hormonală (în special, a vasopresinei - hormon antidiuretic secretat de hipofiza posterioară). Bine înţeles, reglarea normală este posibilă numai între anumite limite de variaţie ale apei din organism. Când acestea sunt depăşite, echilibrul se strică şi apar fie pierderi masive, fie acumulări excesive.

Tabelul XIII.2.

Echilibrul zilnic al apei

Apa ingerată (ml)		*Apa excretată (ml)*	
Din lichidele ingerate aprox.	1500	Eliminare prin urină	1500
Din constituţia alimentelor solide	800	Eliminare prin piele (respiraţie insensibilă)	600
Prin oxidarea principiilor imediate dintr-o raţie care procură 2500 cal: 100 g proteine 41 110 g lipide 118 244 g glucide 135	aprox. 300	Vaporizare la nivelul plămânilor Eliminare prin fecale	400 100
294		Total:	2600 ml
Total aprox.:	2600 ml		

XIII.3.1. NECESARUL ZILNIC DE APĂ

Datele tabelului XIII.2 arată că majoritatea apei ingerate provine din lichide şi apoi din cea aflată în alimentele solide. O cantitate mult mai mică, dar care se formează zilnic, este cea rezultată din oxidarea principiilor imediate, în urma metabolizării lor. Într-adevăr, 1 g glucid (amidon) generează 0,6 g apă, 1 g proteină 0,41 g şi 1 g lipid generează 1,07 g apă metabolică.

Din cauza factorilor de variabilitate (condiţii de climă, natura activităţii depuse) nu s-a putut stabili cu precizie necesarul zilnic de apă. Totuşi, se consideră că adultul sănătos - care desfăşoară o activitate moderată în climă temperată - are nevoie de 1500-2000 ml apă/zi. Nevoile cresc cu 500 ml/zi în caz de transpiraţie datorită climei calde sau activităţii intense şi cu 500-1500 ml/zi în caz de febră, vomismente, diaree. În anumite boli renale necesarul de apă este apreciat la 3000 ml/zi. În toate aceste situaţii aportul de apă trebuie respectat şi împlinit cu stricteţe. Altfel, se produc modificări ale echilibrului hidric iar variaţia lui cu numai 1-2% conduce, în mod inevitabil, la boli grave sau chiar la moarte.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XIII.3.2. PIERDERILE DE APĂ

Aşa cum rezultă din tabelul XIII.2, pierderile de apă au loc în mod obişnuit prin plămâni, piele, urină şi tract gastro-intestinal. La rândul lor, aceste pierderi variază - în mod semnificativ - cu condiţiile de climă, natura raţiei alimentare şi starea de sănătate. Într-adevăr, pierderile de apă prin transpiraţie şi plămâni sunt mult crescute în condiţii de climă uscată, temperaturi ridicate ale mediului ambiant, activitate intensă sau febră (determinată de diverse cauze). În asemenea cazuri, pierderile de apă prin transpiraţie pot depăşi chiar 2,5 L/oră. Pe de altă parte, apa secretată prin tractul gastrointestinal - care în mod obişnuit este reabsorbită - se poate pierde şi ea în cantitate apreciabilă prin diaree sau datorită altor boli intestinale. În ceea ce priveşte apa pierdută prin urină, se consideră că ea variază direct proporţional cu cantitatea de apă ingerată. Însă, independent de aportul hidric, un anumit volum de apă este necesar totdeauna pentru excreţia substanţelor osmotic - active; în special, ureea şi clorura de sodiu. La rândul lor, cantităţile excretate din aceste substanţe depind de aportul proteic şi al sării din raţie. În aceste condiţii, calculele au arătat că fiecare gram de proteină dietară corespunde la 5 mosm. şi fiecare gram de sare (clorură de sodiu) generează 34 mosm (1 mosm = 1 mmol substanţă solubilizată x n; în care n = numărul particulelor produse prin disociere). O raţie obişnuită care conţine 100 g proteine şi 10 g sare generează: (100 x 5) + (10x34)= 840 mosm. Ţinând seama de faptul că rinichiul poate concentra urina la aproximativ 1400 mosm/L, rezultă că numai pentru excreţia acestor substanţe solubile este necesar un volum de 840 : 1400 = 600 *ml* apă.

XIII.3.3. EXCESUL DE APĂ

Ori de câte ori aportul de apă depăşeşte capacitatea de excreţie renală în organism se creiază condiţii pentru acumularea unui exces de apă. Această situaţie nu are loc în mod obişnuit, datorită bunei funcţionări a hipofizei posterioare, rinichiului şi adrenalelor.

Condiţiile în care apa din organism se acumulează în exces sunt următoarele: (1) secreţie mare de hormon antidiuretic (vasopresină) produs de hipofiza posterioară; (2) insuficienţă corticosuprarenaliană; (3) insuficienţă renală acută; (4) boală de inimă congestivă (severă); (5) ciroza ficatului; (6) ingerare exagerată de lichide. Bine înţeles, acumularea excesivă determină şi ea dezechilibrul apei, antrenând astfel tulburări grave în organism.

XIII.4. PROPRIETĂŢIILE FIZICO-CHIMICE ALE APEI

Apa are o serie de proprietăţi fizico-chimice cu totul remarcabile şi care o singularizează faţă de celelalte fluide, făcând-o un lichid aparte.

XIII.4.1. STRUCTURA ŞI POLARITATEA MOLECULEI DE APĂ

Structura moleculei de apă este cea a unui tetraedru regulat care are în centrul său atomul de oxigen. Acesta prezintă patru orbitali hibridizaţi, sp^3. Doi din ei conţin câte un singur electron de valenţă al oxigenului iar ceilalţi doi orbitali conţin câte o pereche de electroni. Orbitalii atomului de oxigen cuprinzând câte un electron se suprapun, fiecare, cu orbitalul 1s a câte unui atom de hidrogen şi formează orbitalii de legătură O-H îndreptaţi către două vârfuri vecine ale tetraedrului. Ceilalţi doi orbitali - cuprinzând fiecare o pereche de electroni neparticipanţi ai oxigenului - sunt îndreptaţi către celelalte două vârfuri ale tetraedrului (Fig. XIII.5).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

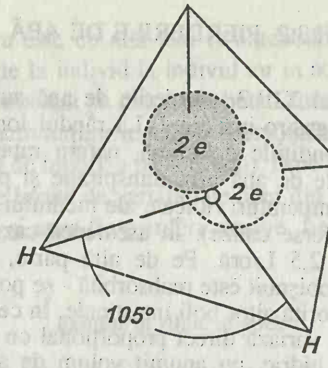


Fig. XIII.5 - Structură tetraedrică a moleculei de apă

Din cauză că perechile de electroni neparticipanţi ai oxigenului exercită o acţiune de respingere asupra electronilor de legătură, unghiul dintre cele două legături O-H este de 105°; puţin mai mic decât unghiul la centru al unui tetraedru regulat (109,5°).

Din punct de vedere electric, molecula de apă este neutră dar distribuţia electronică în cuprinsul ei se face neuniform. Într-adevăr, oxigenul – cu cei 8 protoni în nucleul său – atrage mai puternic electronii de legătură decât atrage unicul proton din nucleul atomului de hidrogen. Altfel spus, regiunea oxigenului este relativ bogată în electroni (deci negativă), pe când regiunea atomilor de hidrogen - practic, lipsiţi de înveliş electronic - este pozitivă. Datorită acestui caracter, mult mai electronegativ al oxigenului, legătura O-H este *polară*. Atomul de oxigen poartă o sarcină parţial negativă de - 0,82 iar fiecare atom de hidrogen are câte o sarcină parţial pozitivă, de +0,41. Această separare a sarcinilor dă naştere unui dipol permanent cu centrul de greutate al sarcinilor negative la atomul de oxigen şi cu cel al sarcinilor pozitive aflat pe bisectoarea unghiului dintre legăturile O-H (Fig. XIII.6).

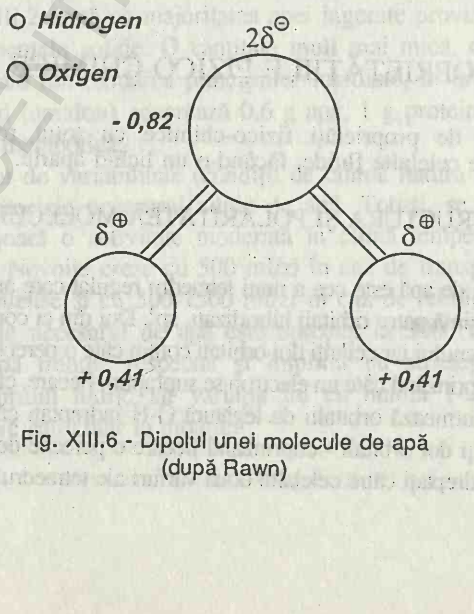


Fig. XIII.6 - Dipolul unei molecule de apă (după Rawn)

XIII.4.2. LEGĂTURA DE HIDROGEN ŞI ASOCIERILE MOLECULARE

Faptul că molecula apei este un dipol are ca primă consecinţă interacţiunea electrostatică ce se stabileşte între regiunea pozitivă a unei molecule şi regiunea negativă a altei molecule. De fapt, interacţiunea electrostatică se exercită între nucleul hidrogenului aparţinând unei molecule dipol de apă şi perechea de electroni neparticipanţi ai oxigenului din altă moleculă. Această atracţie dipol - dipol este numită *legătură de hidrogen* (Fig. XIII.7).

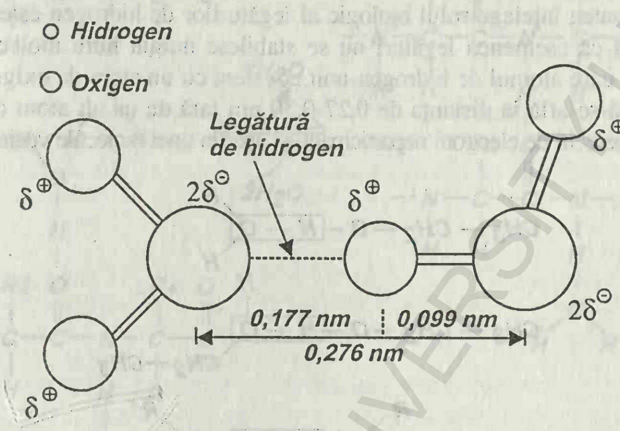


Fig. XIII.7 - Legătura de hidrogen dintre două molecule de apă

Pe de altă parte, caracterul dipolar al moleculelor de apă favorizează şi asocierea lor mutuală, conducând la anumite aranjamente geometrice. Ele sunt întrutotul conforme cu structura geometrică a moleculei de apă (Fig. XIII.8).

Structura de tetrahidrol, corespunzătoare asocierii ilustrate în Fig. XIII.8 (b), este tipică gheţii şi - în oarecare măsură - apei lichide. Complexele acestea rezultate din asociere sunt temporare; ca atare, ele nu durează decât foarte puţin. Într-adevăr, s-a constatat că timpul de înjumătăţire pentru asociere - disociere al moleculelor de apă este aproximativ de o microsecundă. Bine înţeles, în asocierea şi disocierea aceasta, legăturile de hidrogen sunt cele care se stabilesc şi se desfac, fără a se modifica în niciun fel caracterul de dipol al moleculelor respective.

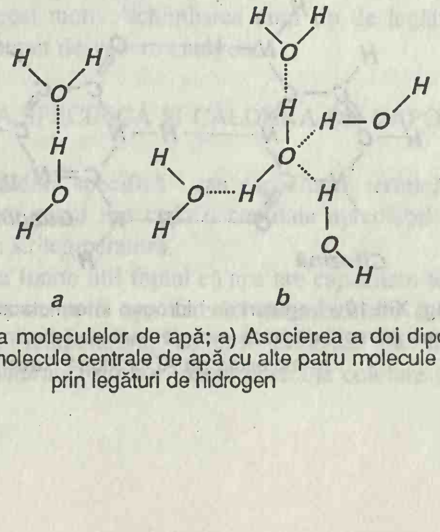


Fig. XIII.8 - Asocierea moleculelor de apă; a) Asocierea a doi dipoli de apă b) asocierea unei molecule centrale de apă cu alte patru molecule de apă prin legături de hidrogen

Din punct de vedere energetic, legăturile de hidrogen sunt mult mai slabe decât legăturile chimice. Astfel, pentru desfacerea unei legături de hidrogen între dipolii apei se cheltuieşte o energie de cca 4,5 $kcal.mol^{-1}$; cu mult mai mică decât cea corespunzătoare desfacerii unei legături covalente O-H, care necesită o energie de 110 $kcal.mol^{-1}$.

Deşi, individual, legătura de hidrogen este slabă, ea participă - în număr mare şi cu rol hotărâtor - la stabilitatea structurală a multor constituenţi importanţi ai organismului (proteine, acizi nucleici) precum şi a unor metaboliţi.

Pentru a se putea înţelege rolul biologic al legăturilor de hidrogen este necesar să se precizeze faptul că asemenea legături nu se stabilesc numai între molecule de apă ci şi în cazurile în care atomul de hidrogen-unit covalent cu un atom de oxigen sau de azot dintr-o moleculă-se află la distanţa de 0,27-0,30 nm faţă de un alt atom de azot sau de oxigen; care au perechi de electroni neparticipanţi şi aparţin unei molecule vecine (Fig. XIII.9).

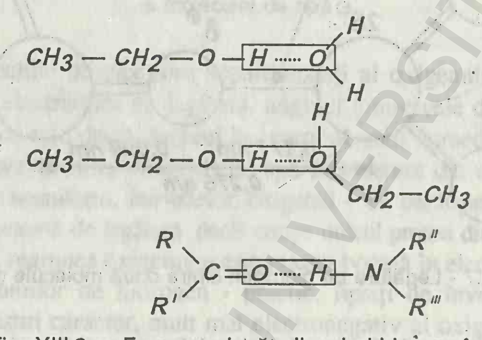


Fig. XIII.9 - Formarea legăturilor de hidrogen între moleculele de alcool şi apă, între două molecule de etanol şi între oxigenul carbonilic al unei peptide şi hidrogenul de la azotul peptidic al unei peptide adiacente

Se constată că multe macromolecule conţin legături de hidrogen (intramoleculare) dar asemenea legături se pot stabili şi între macromolecule diferite (intermoleculare). Aceste două tipuri de legături de hidrogen sunt prezentate în Fig. XIII.10 şi Fig. XIII.11 (după Rawn).

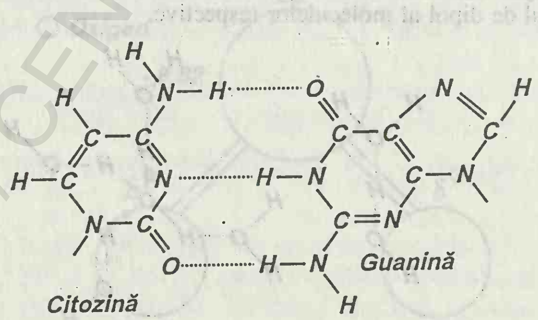


Fig. XIII.10 - Legături de hidrogen intermoleculare, formate între perechi de baze complementare (citozina şi guanina) în molecula de ADN (după Rawn)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

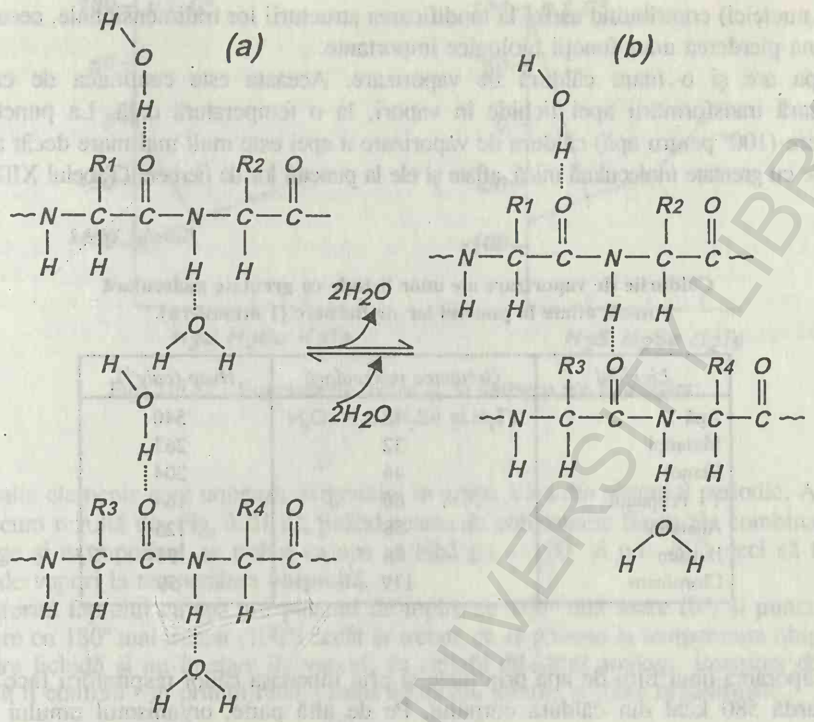


Fig. XIII.11
a) Legături de hidrogen intermoleculare, formate între apă şi câte un lanţ polipeptidic;
b) Legături de hidrogen intermoleculare, formate între cele două lanţuri polipeptidice ale aceleiaşi proteine (după Rawn)

Este de remarcat că stabilităţile legăturilor de hidrogen intra- şi intermoleculare sunt aproximativ egale. Pentru acest motiv, schimbarea unui tip de legătură în celălalt tip prezintă avantaj minim din punct de vedere energetic.

XIII.4.3. CĂLDURA SPECIFICĂ ŞI CĂLDURA DE VAPORIZARE

După amoniac, apa are căldura specifică - sau capacitatea termică - cea mai mare. Datorită acestui fapt ea poate primi sau ceda o cantitate apreciabilă de căldură, fără a-şi schimba simţitor propria sa temperatură.

Pentru organismul viu este foarte util faptul că apa are capacitate termică mare. Într-adevăr, dacă în mediu intern nu ar fi apa care să înmagazineze o cantitate mare de căldură fără a-şi schimba temperatura, căldura eliberată în numeroase reacţii metabolice ar determina denaturarea multor macromolecule celulare (proteine, enzime,

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acizi nucleici) contribuind astfel la modificarea structurii lor tridimensionale, ceea ce ar antrena pierderea unor funcţii biologice importante.

Apa are şi o mare căldură de vaporizare. Aceasta este cantitatea de căldură necesară transformării apei lichide în vapori, la o temperatură dată. La punctul de fierbere (100° pentru apă) căldura de vaporizare a apei este mult mai mare decât a altor lichide cu greutate moleculară mică, aflate şi ele la punctul lor de fierbere (Tabelul XIII.3).

Tabelul XIII.3.

Căldurile de vaporizare ale unor lichide cu greutate moleculară mică, aflate la punctul lor de fierbere (1 atmosferă).

Lichidul	*Greutatea moleculară*	*Hvap (calg^{-1})*
Apă	18	540
Metanol	32	263
Etanol	46	204
1 - Propanol	60	164
Acetonă	58	125
Benzen	78	94
Cloroform	119	59

Evaporarea unui litru de apă prin piele şi prin mucoasa căilor respiratorii face ca să se piardă 580 kcal din căldura corpului. Pe de altă parte, organismul omului adult pierde zilnic (fără a se ţine seama de pierderile prin transpiraţie) cca. 1200 ml apă, eliberând astfel 696 kcal. Pierderile prin transpiraţie sunt şi ele foarte importante; în caz de efort, secreţia sudorală poate creşte până la 1600 ml/oră. Dacă această cantitate de apă se evaporă total, corpul mai pierde încă 928 Kcal/oră. Prin urmare, supraîncălzirea corpului este preîntâmpinată de căldura mare de vaporizare a apei. Acest fapt contribuie la asigurarea desfăşurării normale a proceselor biologice din organism. De altfel, principalele reacţii metabolice au loc numai într-un interval foarte restrâns de temperatură.

XIII.4.4. CĂLDURA DE TOPIRE, PUNCTUL DE TOPIRE ŞI PUNCTUL DE FIERBERE

Apa are şi o căldură de topire apreciabilă: 1,43 kcal mol^{-1}, la 0°. Această valoare ridicată se explică prin faptul că la topirea gheţii este nevoie de energie calorică - luată din mediu înconjurător - pentru desfacerea legăturilor de hidrogen care ţin asociate câte patru molecule de apă în jurul uneia singure (vezi structura tetraedrică a moleculei de apă în Fig. XIII.8 b). Aşa dar, întocmai ca în cazul căldurii de vaporizare, când apa necesită o cantitate mare de căldură ca să-şi schimbe starea fizică din lichidă în vapori, ea necesită o cantitate apreciabilă de căldură şi pentru schimbarea stării fizice din solidă în lichidă.

De asemenei, este de remarcat că apa are temperatura de topire (p.t.) şi temperatura de fierbere (p.f.) mult mai ridicate decât ale analogilor ei (H_2S, H_2Se, H_2Te), dihidraţii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

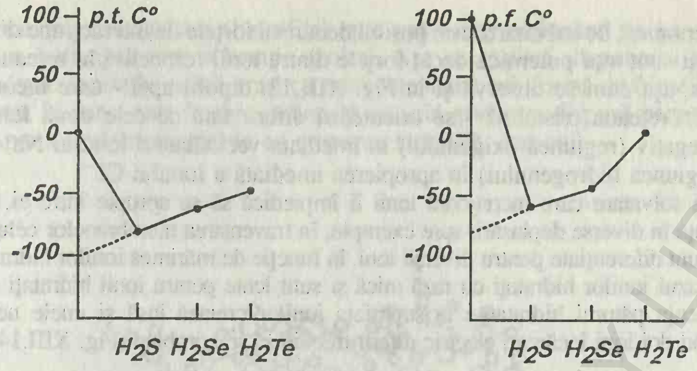


Fig. XIII.12 - Punctele de topire şi de fierbere ale analogilor: H_2O, H_2S, H_2Se şi H_2Te

celorlalte elemente care urmează oxigenului în grupa VI-a din sistemul periodic. Astfel, după cum rezultă din Fig. XIII.12, ţinând seama de constantele fizice ale combinaţiilor analoge şi extrapolând, ar trebui ca apa să aibă p.t. - 100° şi p.f. -80°; deci să fie în stare de vapori la temperatura obişnuită.

Datorită faptului că apa are punctul de topire cu 100° mai mare (0°) şi punctul de fierbere cu 180° mai ridicat (100°) decât ar trebui, ea se găseşte la temperatura obişnuită în stare lichidă şi nu în stare de vapori, ca ceilalţi dihidraţi analogi. Însuşirea de a fi lichidă îi conferă - în primul rând - rolul de mediu intern, în toate organismele.

XIII.4.5. APA CA DIZOLVANT

Apa este cel mai bun şi important dizolvant. Ea dizolvă atât electroliţii (acizi, baze, săruri) cât şi substanţe neionizate (anorganice sau organice).

Dizolvarea electroliţilor se înţelege uşor dacă se ţine seama de faptul că însăşi molecula de apă este un dipol. Din această cauză şi datorită capacităţii apei de a stabili uşor legături de hidrogen, apa interacţionează rapid cu substanţele polare pe care le dizolvă. Practic, când se introduce în apă o asemenea substanţă - spre exemplu, clorură de sodiu (NaCl) în stare solidă - forţele electrostatice care ţin ionii în reţeaua cristalină sunt distruse şi ionii eliberaţi se înconjoară imediat cu câte o pătură hidratantă, formată din molecule de apă, numită sferă de solvatare (Fig. XIII.13).

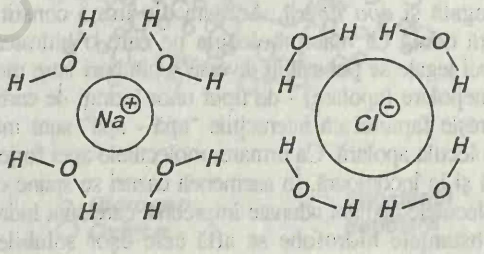


Fig. XIII.13 - Solvatarea ionilor de Na^+ şi Cl^- ca urmare a dizolvării clorurei de sodiu cristaline în apă (după Rawn)

Acest fenomen, de solvatare, este posibil deoarece forţele de interacţiune dintre solvent şi ionii sării sunt mai puternice decât forţele dintre ionii respectivi în reţeaua cristalină. Bineînţeles, aşa cum se observă şi în Fig. XIII.13, dipolii apei - care înconjoară ionii eliberaţi din reţeaua cristalină - se orientează diferit faţă de cele două feluri de ioni: cu polul negativ (regiunea oxigenului) în imediata vecinătate a ionului Na^+ şi cu polul pozitiv (regiunea hidrogenului) în apropierea imediată a ionului Cl^-.

Sfera de solvatare care înconjoară ionii îi împiedică să se apropie între ei, uşurându-le independenţa în diverse deplasări; spre exemplu, în traversarea membranelor celulare. Aceste traversări sunt diferenţiate pentru diverşii ioni, în funcţie de mărimea ionilor hidrataţi; ele sunt rapide în cazul ionilor hidrataţi cu rază mică şi sunt lente pentru ionii hidrataţi cu rază mai mare. Prezenţa păturei hidratante la suprafaţa ionilor creiază însă şi unele neajunsuri; în special, când doi ioni încărcaţi electric diferit trebuie să se combine (Fig. XIII.14).

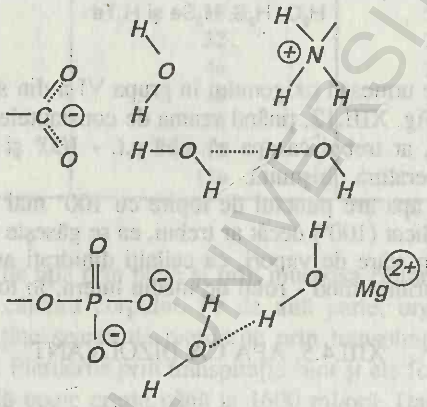


Fig. XIII.14 - Atracţia ionilor de sarcini opuse, în apă

De fapt, din cauză că în apă ionii sunt protejaţi - unul faţă de altul - prin sferele lor de solvatare, atracţia electrostatică dintre o pereche de ioni cu sarcini opuse ajunge să fie foarte mică; practic, egală cu cea corespunzătoare legăturii de hidrogen.

Multe macromolecule care datorită structurii lor chimice cuprind grupări sau atomi susceptibili la stabilirea unor legături de hidrogen cu apa - de tipul proteinelor sau acizilor nucleici - se pot hidrata şi ele. În soluţii apoase diluate, macromoleculele reţin o parte din apă la suprafaţă, constituindu-se astfel *apa legată*. Aşa dar, în soluţie se poate distinge apa legată şi *apa liberă*. Aceasta din urmă constituie mediul în care se deplasează apa legată odată cu macromolecula pe care o hidratează. Este de remarcat că prin intermediul apei legate se pot stabili diverse schimburi între molecule şi apa liberă.

Macromoleculele nepolare (apolare) - de tipul unor hidraţi de carbon - sunt insolubile în apă. Aceasta se datoreşte faptului că interacţiile "apă - apă" sunt mai puternice decât cele dintre apă şi macromolecula apolară. Ca urmare, moleculele apei forţează moleculele apolare să se adune împreună şi le înconjoară. În asemenea cazuri se spune că apa exercită un efect hidrofobic faţă de moleculele apolare adunate împreună, care sunt hidrofobe (Fig. XIII.15).

În opoziţie cu substanţele hidrofobe se află cele uşor solubile în apă - menţionate anterior - care sunt *hidrofile*.

O comportare particulară faţă de apă o prezintă substanţele *amfipatice* caracterizate prin afinitate dublă: pentru apă şi pentru solvenţi apolari. Substanţele amfipatice se

orientează cu grupările polare (hidrofile) spre apă - interacţionând cu ea - şi cu cele hidrofobe se îndreaptă spre solvenţii apolari. Aşa se explică dispunerea substanţelor amfipatice (spre exemplu, acizii graşi cu molecule mari) sub formă de filme la suprafaţa apei. De fapt, în acest caz, fiecare moleculă de acid gras este dispusă perpendicular pe suprafaţa apei având implantată în ea gruparea hidrofilă, carboxil.

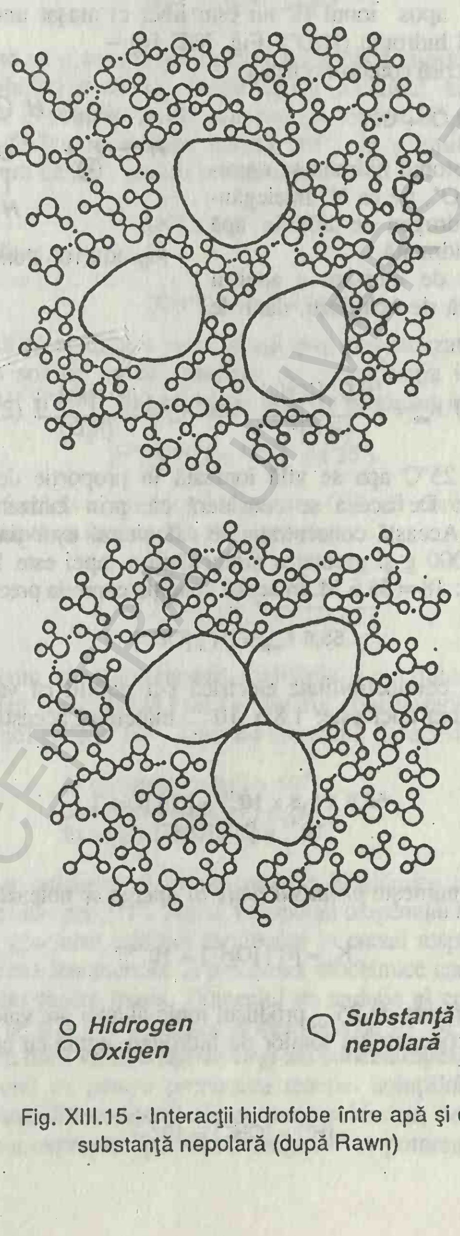


Fig. XIII.15 - Interacţii hidrofobe între apă şi o substanţă nepolară (după Rawn)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XIII.5. PROCESELE HIDROELECTROLITICE

XIII.5.1. IONIZAREA APEI ŞI PRODUSUL IONIC AL APEI

Deşi apa pură - complet lipsită de săruri şi gaze dizolvate - este considerată neelectrolit, ea conduce totuşi curentul electric. La temperatura de 25°, conductibilitatea specifică a apei este de 6×10^{-8} $ohm^{-1} \times cm^{-1}$. Se admite că această conductibilitate electrică a apei se datoreşte faptului că o parte din moleculele ei sunt ionizate. Deoarece în mediu apos ionul H^+ nu este liber ci ataşat unei molecule de apă - constituind astfel ionul hidroniu (H_3O^+) (Fig. XIII.16) – ionizarea apei poate fi scrisă conform ecuaţiei:

$$2\,H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$$

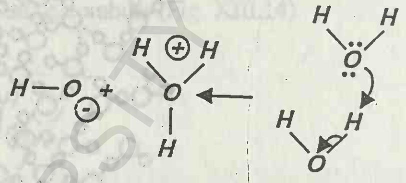


Fig. XIII.16 - Formarea ionului hidroniu

Este de notat că protonul hidratat se reprezintă în scris fie ca H_3O^+, fie ca H^+ înţelegându-se că ionul de hidrogen se află în apă totdeauna sub formă hidratată.

Ecuaţiei reversibile de ionizare a apei îi corespunde o constantă de echilibru, dată de una din expresiile:

$$(1)\ K_{ech} = \frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2} \quad \text{sau} \quad K_{ech} = \frac{[H^+][HO^-]}{[H_2O]}\ (2)$$

La temperatura de 25°C apa se află ionizată în proporţie de o moleculă la 555 milioane de molecule. De aceea se consideră că, prin ionizare, apa practic nu-şi schimbă concentraţia. Această concentraţie se calculează uşor ţinând seama de faptul că 1 l apă are masa 1000 g şi greutatea moleculară a apei este 18 g mol^{-1}. Deci, apa are concentraţia = 1000 : 18 = 55,6 M. În aceste condiţii, expresia precedentă (2) devine:

$$55{,}6\ K_{eck} = [H^+]\,[OH^-]$$

Prin determinări de conductibilitate electrică s-a stabilit că valoarea constantei de echilibru pentru ionizarea apei este: $1{,}8 \times 10^{-16}$. Înlocuind această valoare în expresia anterioară, se obţine:

$$55{,}6 \times 1{,}8 \times 10^{-16} = [H^+]\,[OH^-]$$

deci: $$10^{-14} = [H^+]\,[OH^-]$$

Această expresie se numeşte *produsul ionic al apei* şi se notează cu K_w. Prin urmare,

$$K_w = [H^+]\,[OH^-] = 10^{-14}$$

Deoarece - la temperatura de 25° - produsul ionic al apei are valoarea 10^{-14}, înseamnă că în apa pură la 25° concentraţia ionilor de hidrogen, egală cu cea a ionilor hidroxil, este 10^{-7} ion gram/litru:

$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$$

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Produsul ionic al apei creşte cu temperatura dar la aceeaşi temperatură el este invariabil; nu numai pentru apa pură ci şi pentru orice soluţie apoasă, suficient de diluată.

XIII.5.2. REACŢIA SOLUŢIILOR ŞI pH-UL

O soluţie este neutră, ca apa pură, când cuprinde ioni H^+ şi ioni OH^- în aceeaşi concentraţie. Deci, în apa pură şi în soluţii neutre la 25°:

$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$$

În genere, se spune că o soluţie are reacţie acidă când cuprinde o cantitate oarecare de acid liber (necombinat) şi că are reacţie bazică (alcalină) dacă cuprinde o cantitate de bază necombinată. În soluţiile acide concentraţia ionilor H^+ este mai mare ca în apa pură şi - implicit - decât concentraţia ionilor OH^-. În soluţiile alcaline situaţia este inversă. La temperatura de 25°, pentru soluţii acide:

$$[H^+] > 10^{-7} > [OH^-]$$

şi pentru soluţii alcaline:

$$[OH^-] > 10^{-7} > [H^+]$$

Aceste relaţii arată că aciditatea unei soluţii este caracterizată cantitativ de concentraţia ionilor H^+ din soluţie iar alcalinitatea de concentraţia ionilor OH^-. Însă, între concentraţia ionilor H^+ şi OH^- există relaţia dată de produsul ionic al apei:

$$[H^+]\,[OH^-] = 10^{-14} \quad \text{(la 25°)}.$$

Aceasta arată că fiecărei concentraţii a ionilor OH^- îi corespunde o concentraţie unică şi bine determinată, a ionilor H^+, dată de relaţia:

$$[H^+] = \frac{10^{-14}}{[OH^-]} = \frac{1}{10^{14}\,[OH^-]}$$

Prin urmare, aşa cum se caracterizează acidităţile – cu ajutorul concentraţiei ionilor H^+ – se pot caracteriza şi bazicităţile tot cu ajutorul concentraţiei ionilor H^+; anume, în soluţii bazice (alcaline) $[H^+] < 10^{-7}$. Ţinându-se seamă de acest fapt, se poate scrie:

în soluţii acide $[H^+] > 10^{-7}$
în soluţii neutre $[H^+] = 10^{-7}$
în soluţii alcaline $[H^+] < 10^{-7}$.

Noţiunea de pH şi utilitatea ei. Multe procese biochimice din organism depind de concentraţia ionilor de hidrogen, $[H^+]$. Astfel, transportul oxigenului în sânge, reacţiile chimice catalizate de enzime, generarea energiei metabolice în cursul respiraţiei sunt numai câteva exemple din multitudinea fenomenelor şi proceselor biochimice care depind de concentraţia ionilor de hidrogen din mediu intern. Domeniul de variaţie al concentraţiei ionilor H^+ în organism este enorm; de la 0,1 M în stomac la mai puţin de 10^{-7} M în citosolul celular.

Deoarece ilustrarea unor variaţii aşa de largi ale concentraţiei ionilor de hidrogen este incomodă, s-a convenit ca pentru precizarea reacţiei soluţiilor în locul concentraţiei ionilor H^+ să se folosească logaritmul său cu semn schimbat, desemnat cu simbolul pH. El este o prescurtare a expresiei "pondus hidrogenii" (= puterea hidrogenului).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Oricărei concentraţii a ionilor H^+ îi corespunde o valoare pH bine determinată, definită de ecuaţia:

$$pH = -\log[H^+]$$

Concentraţiei ionilor de hidrogen 10^{-7} îi corespunde pH = 7 iar valorilor concentraţiei ionilor H^+ mai mici decât 10^{-7} corespund valori pH mai mari decât 7; cu atât mai mari, cu cât soluţiile sunt mai alcaline. Aşa dar:

pentru soluţii acide pH < 7
pentru soluţii neutre pH = 7
pentru soluţii alcaline pH > 7

Aceleaşi motive care au condus la introducerea mărimii pH au determinat şi folosirea valorii pOH în locul concentraţiei ionilor OH^-. Deci:

$$pOH = -\log[OH^-]$$

Ţinând seama şi de expresia pOH, rezultă că pentru definirea reacţiei unei soluţii se pot folosi 4 mărimi, cele din coloana "unitate de măsură" a tabelului XIII.4.

Tabelul XIII.4.

Unităţile de măsură utilizate pentru aprecierea reacţiei unei soluţii

Unitatea de măsură	*Reacţia*		
	acidă	*neutră*	*alcalină*
$[H^+]$	$> 10^{-7}$	$= 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
$[OH^-]$	$< 10^{-7}$	$= 10^{-7}$	$> 10^{-7}$
pH	< 7	= 7	> 7
pOH	> 7	= 7	< 7

În legătură cu caracterizarea reacţiei unei soluţii, utilizând oricare din unităţile de măsură din tabelul XIII.4, este de făcut următoarea precizare: unei modificări cu o unitate a valorii pH-ului îi corespund variaţii foarte diferite ale cantităţii de ioni H^+ şi anume: îi corespund variaţii mari când valorile pH sunt mici şi variaţii infime când valorile pH sunt mari. Pe de altă parte, scăderea la jumătate sau dublarea concentraţiei ionilor H^+ dintr-un mediu se manifestă prin creşterea, respectiv scăderea, valorilor pH corespunzătoare cu câte 0,30 unităţi. Acest fapt rezultă imediat din tabelul XIII.5.

Tabelul XIII.5.

Concentraţiile ionilor H^+ şi valorile pH corespunzătoare ale unor soluţii

$[H^+]$ mmol/L	*pH*	*$[H^+]$ mmol/L*	*pH*
20	7,70	60	7,22
25	7,60	70	7,16
30	7,52	80	7,10
35	7,46	100	7,00
40	7,40	120	6,92
50	7,30	140	6,86
		160	6,80

Valorile pH ale unor lichide din organism precum şi ale unor lichide folosite în mod curent (în special, în alimentaţie) sunt prezentate în Fig. XIII.17.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

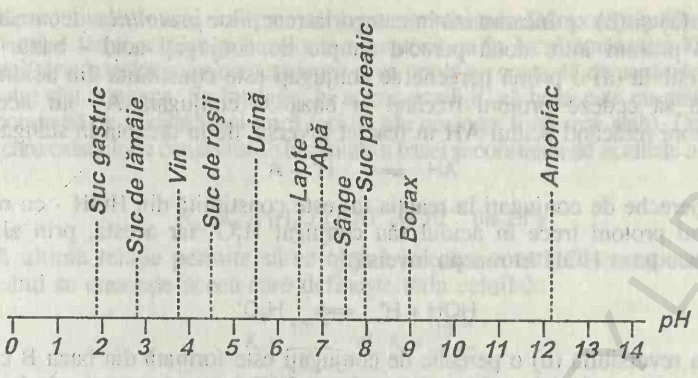


Fig. XIII.17 - Valorile pH ale unor lichide cunoscute

Din Fig. XIII.17 reiese că valoarea pH = 7 a apei pure diferă de cea a sucului pancreatic (pH = 8) cu o unitate, aşa cum diferă şi pH-ul sucului gastric (pH ~2) de cel al sucului de lămâie (pH~3). Însă apreciind cu ajutorul concentraţiei ionilor de hidrogen aceste valori reiese că diferenţa de o unitate de pH între sucul pancreatic şi apa pură corespunde la 90 nmol $[H^+]$/L, pe când diferenţa de aciditate dintre sucul de lămâie şi sucul gastric (corespunzătoare tot unei unităţi de pH) este de 9 mmol $[H^+]$/L sau 9.000.000 nmol; deci de 100.000 ori mai mare. Cele menţionate aici arată că unitatea pH nu are aceeaşi valoare în toate regiunile scării de pH când este apreciată în concentraţie de ioni hidrogen. Aceasta este datorită faptului că între pH şi $[H^+]$ există o relaţie logaritmică şi nu lineară.

Caracterizarea reacţiei (acidă, neutră sau alcalină) unei soluţii se poate face prin măsurători bazate pe diverse metode electrochimice folosind pH - metre, aparate foarte sensibile şi precise.

Determinările exacte de pH sunt utile pentru diagnosticarea unor maladii precum şi pentru aprecierea funcţionării diverselor organe. Spre exemplu, valoarea normală a pH-ului sangvin este 7,4 dar la diabetici ea este mai redusă. O atare situaţie este cunoscută sub numele de *acidoză*. Condiţia opusă, în care pH-ul sangvin este mai mare decât 7,4 se numeşte *alcaloză*. Ea se instalează, în special, în stări de hiperventilaţie pulmonară precum şi în cazul vomismentelor prelungite.

XIII.5.3. SPECII DE ACIZI ŞI BAZE; TĂRIA LOR

Deoarece mediul intern poate fi asemănat perfect cu o soluţie apoasă complexă, comportările acizilor şi bazelor în soluţii apoase prezintă interes deosebit. Aceste comportări sunt expuse - pe scurt - în cele ce urmează, insistându-se asupra contribuţiei lor la păstrarea echilibrului acido-bazic din organism.

În genere, se consideră că un acid este cu atât mai tare cu cât prezintă o tendintă mai puternică de a ceda protoni iar o bază este cu atât mai tare cu cât tinde mai mult să accepte (lege) protoni.

Pentru stabilirea tăriei acizilor şi bazelor se ia în considerare comportarea acestor substante faţă de apă, care reacţionează ca bază faţă de acizi şi ca acid faţă de baze:

$$\text{(a)}\ AH + HOH \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$
$$\text{(b)}\ B + HOH \rightleftharpoons BH^+ + OH^-$$

Reacţiile (a) şi (b) se încadrează în categoria reacţiilor *protolitice* deoarece în ele se mobilizează protoni între două perechi simple de conjugaţi acid - bază. Astfel, în reacţia reversibilă (a) o primă pereche de conjugaţi este constituită din acidul AH care are tendinţa să cedeze protoni trecând în baza sa conjugată A^- iar această bază fixează protoni refăcând acidul AH în reacţia inversă, de la dreapta la stânga:

$$AH \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

A doua pereche de conjugaţi în reacţia (a) este constituită din HOH - cu rol de bază - care fixând protoni trece în acidul său conjugat H_3O^+ iar acesta, prin eliberare de protoni, reface baza HOH în reacţia inversă:

$$HOH + H^+ \rightleftharpoons H_3O^+$$

În reacţia reversibilă (b) o pereche de conjugaţi este formată din baza B cu tendinţa de a fixa protoni trecând în acidul său conjugat BH^+ care - în reacţia de la dreapta la stânga - reface baza eliberând protoni:

$$B + H^+ \rightleftharpoons BH^+$$

A doua pereche de conjugaţi în reacţia (b) este constituită din HOH care în acest caz are rol de acid - cu tendinţa de a ceda protoni trecând în baza sa conjugată OH^-. La rândul ei, această bază prin fixare de protoni, în reacţia inversă, reface acidul HOH:

$$HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

Constanta de echilibru a reacţiei reversibile (a):

$$K_{ech} = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH][HOH]}$$

ajută la caracterizarea tăriei acidului. Într-adevăr, cu cât echilibrul este deplasat mai spre dreapta, deci K_{ech} are o valoare mai mare, cu atât acidul respectiv este mai tare. Însă, dacă în expresia acestei constante de echilibru se înlocuieşte concentraţia apei neionizate cu valoarea ei - practic invariabilă, 55,6 - şi se trece în membrul I, se obţine:

$$K_a = 55{,}6\ K_{ech} = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$$

Noua constantă, K_a, se numeşte *constantă de aciditate* şi ea caracterizează efectiv tăria acidului.

În ceea ce priveşte tăria acizilor, este de remarcat că acizii tari cedează protoni mai uşor decât ionii hidroniu, astfel că în reacţia (a) echilibrul este deplasat total spre dreapta. Bine înţeles, bazele A^- - conjugate cu acizii tari - sunt baze numai principial (în soluţii apoase) căci ele practic, nu fixează protoni. Deci, pentru acizii tari constantele de aciditate nu au sens.

Tăria bazelor se stabileşte în mod similar, plecându-se de la reacţia protolitică (b). Constanta sa de echilibru este:

$$K_{ech} = \frac{[BH^+][HO^-]}{[B][HOH]}$$

iar *constanta de bazicitate* K_b este dată de expresia:

$$K_b = 55{,}6\ K_{ech} = \frac{[BH^+][HO^-]}{[B]}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu cât K_b are o valoare mai mare, cu atât baza este mai tare. Dar pentru uniformizarea unității de măsură a tăriei acizilor și bazelor s-a convenit ca în locul constantei K_b (constantei de bazicitate) tăria bazelor să se caracterizeze și ea printr-o constantă de aciditate, K_a; anume, cea a acidului său conjugat. Se înțelege, în aceste condiții, că baza este cu atât mai tare cu cât are o constantă de aciditate mai mică (acidul său conjugat fiind mai slab). De fapt, relația cantitativă care există între constanta de bazicitate a bazei și constanta de aciditate a conjugatului său este:

$$K_a \cdot K_b = [H_3O^+]\,[OH^-] = 10^{-14} \text{ (la 25°)}$$

Această ultimă relație permite să se obțină imediat constanta corespunzătoare unui conjugat când se cunoaște aceea care definește tăria celuilalt:

$$K_b = \frac{10^{-14}}{K_a} \quad \text{şi} \quad K_a = \frac{10^{-14}}{K_b}$$

Asemănător trecerii de la $[H^+]$ la pH, se poate face și trecerea de la valorile constantelor de aciditate, K_a, exprimate prin puteri negative ale lui 10, la logaritmii lor negativi, obținându-se valori $_pK_a$:

$$pK_a = -\log K_a$$

Ținând seama de simbolul pK_a, acizii se pot clasifica astfel: *acizi tari* cu $pK_a < 1$; *acizi de tărie mijlocie* cu pK_a cuprins între valorile 1 și 5; *acizi slabi* cu $pK_a > 5$.

Majoritatea acizilor cu însemnătate metabolică deosebită, aflați în țesuturile și fluidele din organism, sunt acizi de tărie mijlocie sau slabă. Aceștia împreună cu constantele lor de aciditate, exprimate în ambele moduri (K_a și pK_a), figurează în Tabelul XIII.6.

Tabelul XIII.6.

Valorile constantelor de aciditate (K_a și pK_a) ale unor acizi importanți din punct de vedere biochimic, determinate la temperatura de 25°

Acid	K_a	pK_a
H_2CO_3	$4{,}30 \times 10^{-7}$	6,37
HCO_3^-	$5{,}61 \times 10^{-11}$	10,25
H_3PO_4	$7{,}52 \times 10^{-3}$	2,12
$H_2PO_4^-$	$6{,}23 \times 10^{-8}$	7,21
HPO_4^{2-}	* $2{,}20 \times 10^{-13}$	* 12,67
CH_3—COOH	$1{,}76 \times 10^{-5}$	4,75
HOOC—$(CH_2)_3$—COOH		
treapta I	$4{,}58 \times 10^{-5}$	4,34
treapta II	$3{,}89 \times 10^{-6}$	5,41
HOOC-CH_2—C(OH)(COOH)—CH_2—COOH		
treapta I	$8{,}40 \times 10^{-4}$	3,08
treapta II	$1{,}80 \times 10^{-5}$	4,74
treapta III	$4{,}00 \times 10^{-6}$	5,40
NH_4^+	$5{,}62 \times 10^{-10}$	9,25
CH_3—NH_3^+	$2{,}70 \times 10^{-11}$	10,66

* Determinări la temperatura de 18°.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ecuaţia Henderson - Hasselbalch. Între constanta de aciditate a unui acid (de tărie mijlocie sau slabă) aflat în soluţie apoasă şi concentraţia ionilor de hidrogen (pH-ul) din soluţia respectivă se află o relaţie strânsă, bine determinată, cunoscută sub numele de *ecuaţia Henderson - Hasselbalch.* Ea poate fi stabilită uşor plecând chiar de la expresia constantei de aciditate a acidului din soluţie. Astfel, prin referire la cazul general al unui acid de tărie mijlocie sau slabă care reacţionează protolitic cu apa - conform reacţiei precedente (a) - s-a stabilit că expresia constantei de aciditate a acidului, AH, este:

$$K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$$

Logaritmând întreaga relaţie se obţine:

$$\log K_a = \log \frac{[A^-]}{[AH]} + \log [H_3O^+]$$

Schimbând locul în termenii ecuaţiei pentru $\log K_a$ şi $\log [H_3O^+]$, se ajunge la relaţia:

$$-\log [H_3O^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{sau} \quad pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Aceasta este ecuaţia Henderson - Hasselbalch care pune direct în relaţie constanta de aciditate a unui acid, aflat în soluţie apoasă, cu pH-ul soluţiei respective.

Ţinând seama de faptul că în ecuaţia Henderson - Hasselbalch figurează concentraţia unei baze anionice, $[A^-]$, acceptoare de protoni şi concentraţia acidului nedisociat, [AH], care are tendinţa să cedeze protoni, ecuaţia poate fi modificată - exprimând-o în forma ei cea mai generală - astfel:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acceptor de protoni}]}{[\text{donor de protoni}]}$$

După cum se va vedea mai departe, ecuaţia Henderson-Hasselbalch este foarte utilă şi pentru explicarea modului de funcţionare a sistemelor tampon.

XIII.6. ECHILIBRUL ACIDO-BAZIC

În organismul omului, reacţia mediului intern este uşor crescută peste neutralitate; pH: 7,35 - 7,45. Păstrarea acestor limite de variaţie este imperioasă pentru desfăşurarea normală a tuturor proceselor vitale.

Pentru menţinerea constantă a pH-ului în mediu intern organismul foloseşte trei mecanisme funcţionale:

a) neutralizarea acizilor şi bazelor de către sistemele tampon;

b) eliminarea renală a excesului de acizi;

c) eliminarea pulmonară a dioxidului de carbon (cel mai frecvent şi abundent produs final de metabolism).

Înţelegerea modului în care sistemele tampon neutralizează acizii şi bazele presupune cunoaşterea proprietăţii fundamentale a *substanţelor tampon.* Acestea, sub formă de soluţie, se opun modificării pH-ului propriu la adaosul unui acid sau al unei baze. Cu alte cuvinte, ele "tamponează" acizii şi bazele. Amestecul, în soluţie, a două substanţe tampon cu acţiuni complementare - în sensul că una din ele se opune scăderii pH-ului determinată de adaosul unui acid - iar cealaltă se opune creşterii pH-ului - determinată de adaosul unei baze - formează un *sistem tampon.* Cele două substanţe din constituţia oricărui sistem tampon pot fi: un acid slab şi sarea sa alcalină sau o bază slabă şi sarea

sa acidă. Indiferent de natura ei chimică (acid, bază, sare) componenta sistemului care neutralizează acizii se numeşte *componentă bazică* iar cea care neutralizează bazele este *componenta acidă*. Soluţia fiecărui sistem tampon are un anumit pH, dat de ecuaţia Henderson - Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{ acceptor de protoni }]}{[\text{ donor de protoni }]}$$

în care K_a este constanta de aciditate a componentei acide, acceptorul de protoni este componenta bazică iar donorul de protoni este componenta acidă a sistemului tampon considerat.

În cursul funcţionării (tamponării) componentele sistemului trec una în cealaltă. Astfel, la adaosul de acid (deci de ioni H^+) în soluţia unui sistem tampon constituit dintr-un acid AH şi baza sa anionică A^-, această componentă bazică acceptă protonii şi trece în acidul său conjugat (neionizat):

$$A^- + H^+ \longrightarrow AH$$

În mod similar, cînd în soluţia sistemului se introduce o bază (deci ioni OH^-) componenta acidă AH eliberează protoni neutalizând ionii OH^- şi ea trece în baza sa conjugată:

$$AH + OH^- \longrightarrow HOH + A^-$$

Bine înţeles, cantitatea de acid sau de bază care se adaugă sistemului tampon nu trebuie să fie prea mare căci atunci capacitatea tampon a sistemului este depăşită.

Capacitatea tampon a unui sistem tampon se exprimă în unităţi definite astfel: un sistem tampon are capacitatea tampon unitară (1) când la 1000 ml soluţie tampon trebuie să se adauge un echivalent de acid tare sau de bază tare pentru ca pH-ul sistemului să se schimbe cu o unitate. Prin urmare, dimensiunea capacităţii tampon este: n Echiv/L/pH.

Un sistem tampon este cu atât mai eficace cu cât concentraţia lui globală (suma concentraţiilor componentelor) este mai mare, căci consumarea lor în timpul tamponării nu este apreciabilă; pe de altă parte, eficacitatea unui sistem tampon este cu atât mai mare cu cât raportul dintre concentraţiile componentelor este mai apropiat de 1 (deci ambele concentraţii sunt mai apropiate) căci consumul lor în timpul tamponării le îndepărtează mai puţin. De fapt, se consideră că efectul tampon este maxim numai când pH-ul soluţiei respective variază într-un interval foarte strâns în jurul valorii pK_a; practic, egal cu $pK_a \pm 2$ unit. pH.

Cele mai importante sisteme tampon care funcţionează permanent în organism sunt: (1) sistemul acid carbonic - bicarbonat, (2) sistemul fosfaţilor, (3) sistemul proteinelor şi (4) sistemul hemoglobinei (care reprezintă un caz particular de sistem tampon cu componentă proteică).

XIII.6.1. SISTEMUL TAMPON ACID CARBONIC - BICARBONAT

Acţiunea tampon conferită sângelui depinde, în primul rând, de echilibrul ce se stabileşte între trei constituenţi ai săi: acid carbonic, bicarbonat şi dioxidul de carbon provenit din respiraţia tisulară. Acesta din urmă se află în sânge atât sunt formă dizolvată, $CO_{2(aq)}$ cât şi sub formă gazoasă, $CO_{2(g)}$, prezent în aerul din interstiţiile pulmonare. Echilibrul global al celor trei componente este rezultatul însumării a trei echilibre parţiale ((a), (b) şi (c)).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Primul echilibru parţial este cel corespunzător disocierii reversibile a acidului carbonic:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

(a) $$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Acesta este afectat de un al doilea echilibru, stabilit între dioxidul de carbon dizolvat şi acidul carbonic:

$$CO_2(aq) + HOH \rightleftharpoons H_2CO_3$$

(b) $$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(aq)][H_2O]}$$

Însă dioxidul de carbon dizolvat este în echilibru cu cel gazos:

$$CO_2(g) + H_2O \rightleftharpoons CO_2\,(aq)$$

(c) $$K_3 = \frac{[CO_2(aq)]}{[CO_2(g)][H_2O]}$$

Pentru a se afla echilibrul global care caracterizează capacitatea tampon a sângelui, dependentă de acest sistem, se fac următoarele operaţiuni matematice asupra celor trei constante de echilibru stabilite anterior:
- se rezolvă relaţia (b) în favoarea $[H_2CO_3]$ şi se substitue în (a), obţinându-se:

(d) $$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_2[CO_2(aq)][H_2O]}$$

- se rezolvă relaţia (c) în favoarea lui CO_2 (aq) şi se substituie în (d). Se obţine:

(e) $$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_2 \cdot K_3[CO_2(g)][H_2O]^2}$$

- se trec toate valorile constante în primul termen şi se obţine:

(f) $$K_4 = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3[H_2O]^2 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2(g)]}$$

Deoarece dioxidul de carbon gazos este întrutotul corespunzător presiunii sale parţiale în spaţiul aerian pulmonar, în expresia precedentă (f) se poate face înlocuirea: $[CO_2(g)]$ cu $pCO_2(g)$. Deci:

(g) $$K_4 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{pCO_2(g)}$$

Această ultimă ecuaţie arată că, de fapt, capacitatea tampon a sângelui depinde numai de concentraţia bicarbonatului (anionului bicarbonic) pe care-l conţine şi de presiunea parţială a dioxidului de carbon aflat în aerul pulmonar. Într-adevăr, dacă pH-ul sangvin

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este ameninţat să scadă din cauza unui proces metabolic în care apare un exces de ioni H^+, componenta bazică a acestui sistem, HCO_3^-, intervine conform reacţiei:

$$H^+ + HCO_3^- \longrightarrow H_2CO_3$$

Acidul carbonic rezultat se descompune imediat:

$$H_2CO_3 \longrightarrow CO_2(aq) + H_2O$$

iar $CO_2(aq)$ trece în fază gazoasă, mărind pCO_2 în plămâni; de unde se elimină ulterior prin expiraţie. Cu alte cuvinte, creşterea concentraţiei ionilor de hidrogen în sânge are ca efect creşterea presiunii dioxidului de carbon la nivel pulmonar.

În situaţia inversă tamponării acizilor, dacă - datorită unui proces metabolic - pH-ul sangvin este ameninţat să crească, el este repede restaurat graţie faptului că dioxidul de carbon aflat în atmosfera pulmonară trece în faza apoasă şi formează acidul carbonic în sângele din capilarele pulmonare. (Fig. XIII.18).

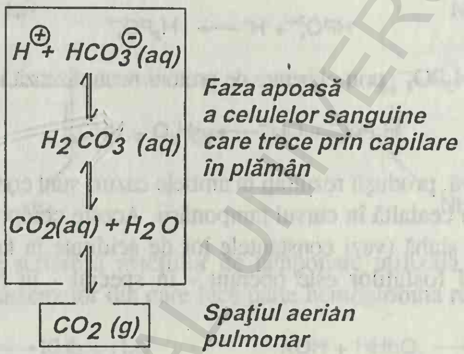


Fig. XIII.18 - Reglarea pH-ului sangvin prin sistemul tampon acid carbonic-bicarbonat (după Rawn)

Acidul carbonic fiind - până la urmă - componenta acidă a sistemului, se opune tendinţei alcalinizante, neutralizând-o:

$$H_2CO_3 + OH^- \longrightarrow H_2O + HCO_3^-$$

Aşadar, indiferent dacă în mediu intern apare o tendinţă acidifiantă sau alcalinizantă, rezerva de dioxid de carbon gazos (din aerul pulmonar) se face utilă şi le neutralizează intervenind - cum s-a arătat - prin componentele sistemului tampon acid carbonic - bicarbonat. Deoarece această rezervă de dioxid de carbon gazos din plămâni este apreciabilă şi se poate modifica - după nevoie - prin ritmul respirator, pH-ul sangvin rămâne neschimbat, în condiţii normale.

În genere, se consideră că sistemul tampon acid carbonic - bicarbonat este cel mai răspândit din punct de vedere cantitativ şi funcţionează eficient atât în lichidul extracelular cât şi în plasmă. În mod normal, în plasmă şi lichidul extracelular raportul bicarbonat/acid carbonic este 20/l şi pH-ul mediului respectiv are valoarea 7,4. Când în

sânge creşte mult concentraţia bicarbonatului sau scade apreciabil concentraţia acidului carbonic, pH-ul depăşeşte valoarea normală (7,35 - 7,45) şi apare starea de alcaloză. În condiţii inverse, pH-ul scade sub limita inferioară (7,35), declaşându-se starea de *acidoză*. După cum s-a mai menţionat, o asemenea situaţie se întâlneşte la diabetici. Într-adevăr, în diabet pH-ul sangvin poate scădea chiar până la valoarea 6,8 (care este fatală).

XIII.6.2. SISTEMUL TAMPON AL FOSFAŢILOR

Acest sistem este alcătuit din două săruri: fosfat monohidrogenat (Na_2HPO_4 sau K_2HPO_4) - care constituie componenta bazică a sistemului - şi fosfat dihidrogenat (NaH_2PO_4 sau KH_2PO_4) care este componenta acidă. De fapt, componentele funcţionale în cursul tamponării sunt anionii acestor săruri: HPO_4^{2-} şi $H_2PO_4^-$. La pH-ul normal (= 7,4), concentraţia anionului fosfat monohidrogenat este aproximativ de 5 ori mai mare decât cea a anionului fosfat dihidrogenat.

Componenta bazică, HPO_4^{2-}, tamponează acizii fixând ionii H^+ eliberaţi de acid:

$$HPO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow H_2PO_4^-$$

Componenta acidă, $H_2PO_4^-$, prin eliberare de protoni neutralizează ionii OH^- ai bazelor:

$$H_2PO_4^- + OH^- \longrightarrow H_2O + HPO_4^{2-}$$

După cum se observă, produşii rezultaţi în ambele cazuri sunt componentele sistemului şi care au trecut una în cealaltă în cursul tamponării. Aceste componente sunt, respectiv, un acid slab şi o bază slabă (vezi constantele lor de aciditate în tabelul XIII.6).

Sistemul tampon al fosfaţilor este operant - în special - în hematii şi în celulele tubulilor renali.

XIII.6.3. SISTEMUL TAMPON AL PROTEINELOR

Acest sistem deşi este predominant în celulele ţesuturilor, operează şi în plasmă. În constituţia lui intră proteine care funcţionează ca anioni la pH-ul slab alcalin al mediului intern. În combinaţie cu ioni H^+, anionii proteici constituie componenta acidă a sistemului (H - proteină) şi tamponează bazele tari iar în combinaţie cu cationii metalelor alcaline (Na, K) formează componenta bazică (Na - proteină sau K - proteină) şi tamponează acizii tari.

Mecanismul tamponării, în ambele cazuri, poate fi redat prin reacţii de felul:

$$HCl + Na\text{ - proteină} \longrightarrow NaCl + H\text{ - proteină}$$

$$NaOH + H\text{ - proteină} \longrightarrow H_2O + Na\text{ - proteină}$$

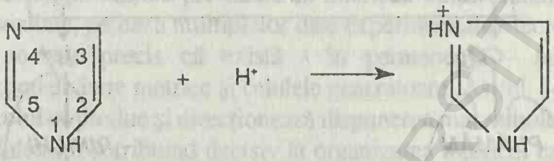
Se observă - şi în cazul acesta - că prin tamponare acidul şi baza tare au trecut în produşi neutri (NaCl, H_2O) iar componentele sistemului s-au transformat una în cealaltă. Fiecare din ele prezintă aciditate sau bazicitate moderată astfel încât pH-ul mediului nu este afectat (cum ar fi fost, fără tamponare, în prezenţa acidului tare, sau a bazei tari).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

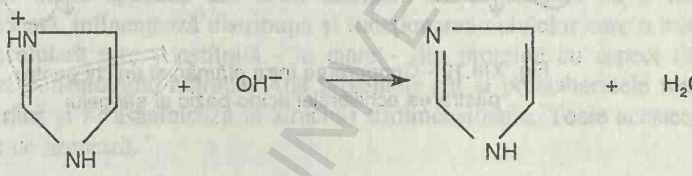
XIII.6.4. SISTEMUL TAMPON AL HEMOGLOBINEI

Hemoglobina intră în constituţia a două sisteme tampon: (a) hemoglobină acidă (HHb) - hemoglobinat de potasiu (KHb) şi (b) oxihemoglobină acidă ($HHbO_2$) - oxihemoglobinat de potasiu ($KHbO_2$).

Ambele sisteme îşi pot exercita acţiunea tampon datorită faptului că hemoglobina cuprinde, în partea sa proteică, multe resturi de histidină. Într-adevăr, nucleul imidazolic din constituţia histidinei are capacitatea să accepte şi să cedeze H^+ la unul din atomii de azot (cel din poziţia 4) ai heterociclului. Astfel, nucleul imidazolic funcţionează ca bază:



sau ca acid:



Păstrând forma de scriere a reacţiilor de tamponare utilizată la sistemul tampon al proteinelor, în cazul sistemelor din care face parte hemoglobina reacţiile respective sunt:

$$KOH + HHb \longrightarrow KHb + H_2O \qquad KOH + HHbO_2 \longrightarrow KHbO_2 + H_2O$$

şi

$$HCl + KHb \longrightarrow HHb + KCl \qquad HCl + KHbO_2 \longrightarrow HHbO_2 + KCl$$

Şi de data aceasta, acidul tare şi baza s-au transformat, în urma tamponării, în produşi neutri (sare, apă). Totodată, componentele sistemului au trecut una în cealaltă păstrând aciditatea şi bazicitatea lor moderată, fără a fi afectat pH-ul mediului.

XIII.6.5. COOPERAREA PLĂMÂN-RINICHI

Alături de sistemele tampon, celelalte două modalităţi de menţinere constantă a echilibrului acido-bazic în mediu intern se realizează prin cooperarea dintre plămân şi rinichi. Într-adevăr, aşa cum s-a menţionat la descrierea sistemului tampon acid carbonic - bicarbonat, plămânul are o rezervă apreciabilă de dioxid de carbon gazos pe care o poate modifica prin ritmul respirator. De fapt, eliberând mai mult sau mai puţin dioxid de carbon - în funcţie de amplitudinea şi frecvenţa respiraţiei - plămânul acţionează direct şi rapid asupra echilibrului acid carbonic - bicarbonat din mediul intern. Această intervenţie rezultă imediat din schema ilustrată în Fig. XIII.19.

Pe de altă parte, rinichiul intervine şi el asupra aceluiaş echilibru acid carbonic - bicarbonat, restabilind concentraţia sangvină a anionilor HCO_3^- prin reabsorbţie şi eliminând ionii H^+ (Fig. XIII.19). Trebuie însă precizat că ionii H^+ nu sunt eliminaţi, ca atare, total prin urină ci rinichiul are capacitatea de a-i neutraliza - în bună parte - înglobându-i fie în ioni NH_4^+ prin combinarea lor cu amoniac ($H^+ + NH_3 \longrightarrow NH_4^+$), fie în anioni $H_2PO_4^-$, în urma reacţiei: $HPO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow H_2PO_4^-$.

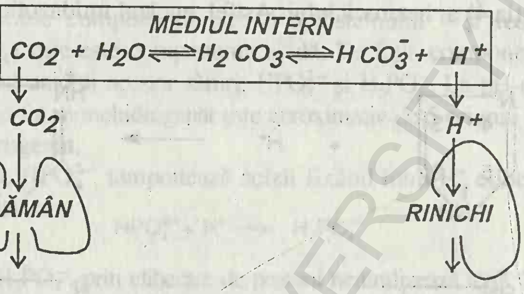


Fig. XIII.19 - Cooperarea între plămân şi rinichi pentru păstrarea echilibrului acido-bazic al sângelui

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. XIV. MATRICEA EXTRACELULARĂ

În concepţia clasică matricea extracelulară este considerată ca un suport inert generat de anumite celule pe care acestea stau fixate. În funcţie de natura formaţiunii căreia aparţin, celulele generatoare de matrice au primit diferite denumiri: *fibroblaşti* care predomină în fibrele de legătură, *condroblaşti* care formează cartilajele, *osteoblaşti* care participă la constituirea oaselor.

Actualmente concepţia clasică privitoare la matricea extracelulară este completată, căpătând o noua viziune, pe baza multiplelor date experimentale efectuate în acest scop. Într-adevăr, azi se ştie precis că există - în permanenţă - numeroase legături structurale şi funcţionale între matrice şi celulele generatoare. Astfel, s-a constatat că unii constituenţi intracelulari produc şi direcţionează dispunerea macromoleculelor matriceale pe suprafeţele celulelor, contribuind decisiv la organizarea matricei extracelulare. Pe de altă parte, diverse studii speciale din acest domeniu au demonstrat că o matrice extracelulară, ordonată, influenţează distribuţia şi funcţionarea celulelor care o susţin.

Matricea extracelulară este constituită - în mare - din proteine cu aspect fibrilar incluse într-un gel polizaharidic hidratat. Atât proteinele cât şi polizaharidele matricei interacţionează strâns şi se asamblează în structuri tridimensionale. Toate acestea sunt prezentate în cele ce urmează.

XIV.1. CONSTITUENŢII CHIMICI AI MATRICEI EXTRACELULARE

XIV. 1.1. PROTEINELE

Din matricea extracelulară s-au izolat iniţial două proteine: una extrasă cu acizi şi alta cu soluţii alcaline diluate. Faptul că ambele proteine precipită, în anumite condiţii, sub formă de fibre cu proprietăţi asemănătoare fibrelor de colagen a făcut ca ele să fie considerate, respectiv, drept colagen acido-solubil şi colagen alcalino-solubil. Acesta din urmă ar putea fi socotit adevăratul precursor al fibrelor de colagen.

Matricea extracelulară cuprinde şi proteine serice, aşa cum conţine şi ioni minerali identici cu cei ai serului sangvin.

Unele studii efectuate cu ajutorul isotopilor radioactivi au arătat că diversele proteine din matrice prezintă un metabolism foarte intens, stimulat de procese degradative proteolitice. Printre enzimele participante mai frecvent la aceste degradări s-au pus în evidenţă colageneza şi tripsina.

Este de remarcat că în matricea extracelulară există diverse tipuri de fibre elastice care se deosebesc între ele prin proteinele constitutive: colagen, elastină, reticulină. Aceasta din urmă este o proteină asemănătoare colagenului dar diferă de el prin faptul că cuprinde şi multe poliozide. Însă proteinele predominante în fibrele matriceale sunt colagenul şi elastina.

Colagenul

Colagenul este cea mai abundentă proteină din organismul uman. El se află în proporţie de 25% din totalitatea proteinelor corpului. După cum rezultă din Tabelul XIV.1, organele moi cuprind puţin colagen; în schimb, organele de tipul pielei şi tendoanelor conţin colagen mai mult de 70% (din greutatea lor uscată). În cazul osului, deşi colagenul reprezintă numai 23% din masa uscată, această cantitate corespunde la aproximativ 90% din matricea lui organică.

Tabelul XIV.1.

Concentraţia colagenului, elastinei şi proteoglicanilor polianionici din unele organe (g/100 g ţesut uscat).

Organ	*Colagen*	*Elastină*	*Proteoglicani anionici*
Oase (demineralizate)	88	-	0,8
Oase (în totalitate)	22,8	-	0,2
Tendonul lui Achile	86	4,4	0,5
Piele	71,9	0,6	-
Cornee	68,1	-	4,5
Cartilaj	46-64	-	20,4-37,1
Ligament	17	74	-
Aortă	12,24	30-57	5,9
Plămân	10	3-7	-
Ficat	3,9	0,16-0,30	-

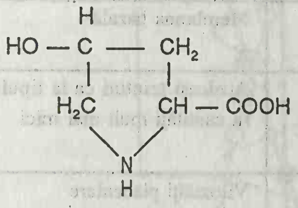
Principala funcţie a colagenului în organism este de a conferi rezistenţă şi de a păstra integritatea structurală a ţesuturilor în constituţia cărora intră. Totodată, colagenul este unicul constituent al organismelor superioare care prezintă rezistenţă la tracţiune.

Pe baza unor studii mai vechi, a dăinuit multă vreme părerea că în organism colagenul care se formează în cursul dezvoltării rămâne tot restul vieţii. Aceasta revine la a spune că pentru colagen nu ar exista o stare dinamică de reînoire, aşa cum există pentru alte proteine. O serie de cercetări ulterioare au arătat însă că în diverse procese normale (involuţia uterului după naştere, vindecarea rănilor) şi patologice (scorbut) colagenul este supus şi el unor importante procese metabolice de biosinteză sau degradative. De altfel, cauzele mai multor boli, între care şi ateroscleroza, sunt explicate - în mare măsură - prin modificări survenite în metabolismul colagenului. Bineînţeles, acest metabolism implică biosinteza şi degradarea colagenului (colagenoliza). Ambele procese sunt descrise în cele ce urmează.

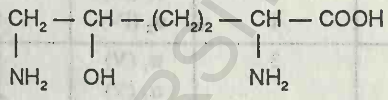
a) *Biosinteza colagenului.* Acest proces este astăzi bine cunoscut. El presupune parcurgerea a 10 etape ce se succed într-o secvenţă bine ordonată şi care permit trecerea

de la aminoacizi liberi la fibrila de colagen. Aceste etape sunt: (1) asamblarea aminoacizilor; (2) hidroxilarea unor resturi de prolină (prolil) şi de lizină (lizil); (3) formarea helixului; (4) glicozilarea; (5) expulzarea din celulă; (6) transportul la fibrila în creştere; (7) transformarea procolagenului în colagen; (8) formarea aldehidelor; (9) formarea fibrilei; (10) stabilirea legăturilor încrucişate.

Unirea aminoacizilor are loc în fibroblaşti, trecându-se prin aceleaşi etape prin care se biosintetizează toate proteinele. Este caracteristic însă faptul că printre aminoacizii constitutivi predomină glicina (33%) reprezentând fiecare al treilea rest aminoacidic (X - Y - Gli)$_n$. Într-o măsură mai mică (23%) se află prolina iar într-o proporţie şi mai redusă se găsesc doi aminoacizi atipici: hidroxiprolina şi hidroxilizina:



4-hidroxiprolina



5-hidroxilizina

Aceşti doi aminoacizi atipici provin din prolină şi lizină iar hidroxilarea lor se face în prezenţa anumitor enzime (prolilhidroxilaza şi lizilhidroxilaza). În ceea ce priveşte prolilhidroxilaza, s-a dovedit că pentru a fi activă enzima necesită prezenţa oxigenului molecular, a ionilor Fe^{2+} şi a vitaminei C. (Întreg acest sistem funcţionează prin cuplare cu oxidarea α - cetoglutaratului la succinat.) Se înţelege, în aceste condiţii, că deficienţa vitaminei C afectează hidroxilarea şi - prin urmare - obţinerea unui colagen normal.

Procesul de asamblare al aminoacizilor decurge rapid; 200 aminoacizi/minut. Aceasta înseamnă că biosinteza unei catene de 1000-1100 aminoacizi are loc în 5-6 minute.

Lanţurile polipeptidice rezultate iau conformaţia elicei şi de acceea, se numesc lanţuri α. Deoarece secvenţele de aminoacizi şi hidroxilările la nivelul resturilor prolil sau lizil nu sunt identice în toate lanţurile polipeptidice, se constitue - în genere - două feluri de lanţuri α numite respectiv - lanţuri α_1 (cu variantele I, II, III, IV) şi lanţuri α_2. Acestea sunt totuşi omoloage fiind formate din circa 1050 resturi de aminoacizi şi având în multe poziţii secvenţe identice. Lanţurile α au masa de 90 - 95 kdaltoni.

În organismele superioare (specii de vertebrate evoluate) s-au evidenţiat - până în prezent - 11 tipuri de colagen şi nu este exclus să se mai descopere şi alte tipuri.

Tipurile de colagen cunoscute actualmente se deosebesc prin structura lor la nivel molecular: fie din cauza modificărilor survenite în procesele care au loc după trans-laţiile intra - şi extracelulare în cursul biosintezei, fie datorită diverselor asamblări şi organizări posibile a moleculelor în structurile supramoleculare.

Cele 11 tipuri de colagen cunoscute, caracteristicile lor structurale şi principalele surse de extracţie sunt menţionate în Tabelul XIV.2.

Tabelul XIV.2.

Tipurile de colagen

Tipul colagenic	*Nr. lanţurilor distincte*	*Lanţuri distincte*	*Masa lanţurilor (kD)*	*Distribuţia tisulară*
Tip I	2 1	α_1 (I) α_2 (I)	95 95	Piele, tendon, os, cornee
Tip II	1	α_1 (II)	95	Cartilaj, disc intervertebral, corp vitros
Tip III	1	α_1 (III)	95	Piele fetală, sistem cardiovascular
Tip IV	2 1	α_1 (IV) α_2 (IV)	170- 185	Membrana bazală
Tip V	3	α_1 (V) α_2 (V) α_3 (V)	130- 200	Aceleaşi ţesuturi ca la tipul I, dar în cantităţi mult mai mici
Tip VI	3	α_1 (VI) α_2 (VI) α_3 (VI)	140- 240	Vilozităţi placentare
Tip VII	1	α_1 (VII)	170	Membrane placentare
Tip VIII	1	α_1 (VIII)	~ 150	Celule endoteliale
Tip IX	3	α_1 (IX) α_2 (IX) α_3 (IX)	85	Cartilaj hialin
Tip X	1	α_1 (X)	59	Cartilaj hialin
Tip XI	3	α_1 (XI) α_2 (XI) α_3 (XI)	~ 100	Cartilaj hialin

Dintre cele 11 tipuri distincte de colagen, cele mai răspândite în organismele superioare sunt primele patru tipuri menţionate în Tabelul XIV.2. În formă restrânsă, compoziţia lor moleculară - care exprimă natura lanţurilor constitutive - se scrie adesea în felul următor:

$$\text{I}\,[2\alpha_1(\text{I}),\ \alpha_2(\text{I})];\quad \text{II}\,[3\alpha_1(\text{II})];\quad \text{III}\,[3\alpha_1(\text{III})];\quad \text{IV}\,[2\alpha_1(\text{IV}),\ \alpha_2(\text{IV})].$$

Este de remarcat faptul că lanţurile α din constituţia oricărui tip de colagen se deosebesc de lanţurile α din alte proteine deoarece au "pasul" mult mai mare (9,3 A); deci sunt *mai întinse*. Distanţa dintre doi aminoacizi măsurată în lungimea elicei este de 3,3 A faţă de 1,4 A din lanţurile α obişnuite. Această dispunere spaţială este impusă de

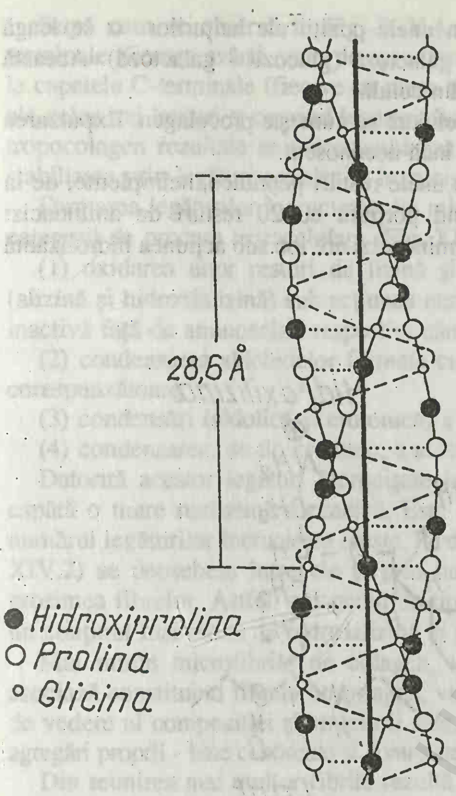
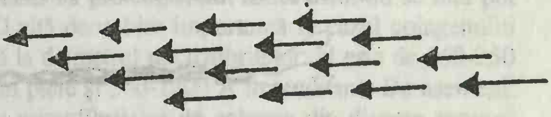


Fig. XIV.1 - Tripla elice a tropocolagenului

Fig. XIV.2 - Asocierea moleculelor de tropocolagen



numeroasele resturi de prolină aflate în lanţ. Într-adevăr, heterociclurile de prolină stânjenesc formarea unei elice *mai strânse* (cu pasul mai mic). Asocierea a trei lanţuri α ($3\alpha_1$ sau $2\alpha_1$ şi $1\alpha_2$) şi împletirea lor, unul asupra altuia, tot în formă helicoidală au ca rezultat formarea unei elice triple cu pasul de ~ 28 A (Fig. XIV.1). În ansamblu, aceasta este structura unităţii de bază a colagenului, numită *tropocolagen* (Fig. XIV.1).

Tropocolagenul se prezintă sub forma unui bastonaş lung (300 nm) şi subţire (1,4 nm). În fibrele de colagen moleculele de tropocolagen sunt asociate atât în lungime cât şi în lăţime. Pe de altă parte, fiecare moleculă este deplasată faţă de cea alăturată cu un sfert din lungimea ei (Fig. XIV. 2). În acest fel fibra capătă un aspect striat; cu zone mai clare separate de zone mai întunecate.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La grupele OH din hidroxilizină aflate în unele poziţii ale lanţurilor α se leagă glicozidic resturi constituite din glucoză şi galactoză (glucozil - galactoză). Această glicozilare (Fig. XIV.3) precede expulzarea din celulă.

Colagenul aflat în stadiu de formare intracelulară se numeşte procolagen. Expulzarea lui din fibroblast are loc printr-un mecanism încă necunoscut.

În spaţiul extracelular procolagenul pierde unele resturi peptidice, neîmpletite, de la capătul N-terminal al lanţurilor care cuprind porţiuni cu 20 resturi de aminoacizi (telopeptide). Îndepărtarea acestor resturi de aminoacizi are loc sub acţiunea hidrolizantă a procolagen - peptidazei (Fig. XIV.4).

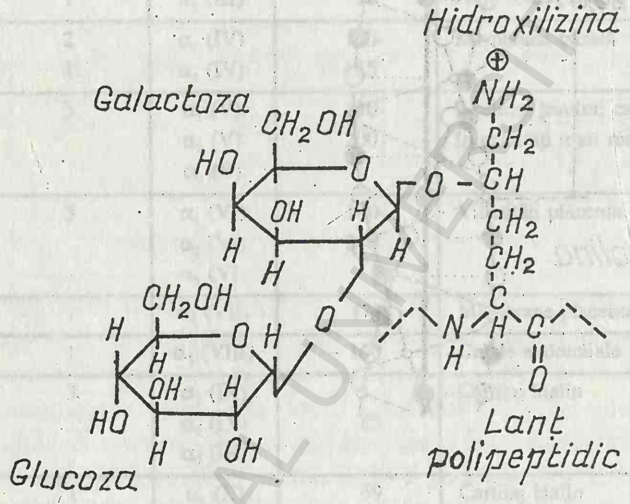


Fig. XIV.3 - Unirea entităţii dizaharidice cu grupul hidroxil al restului de hidroxilizină din catena polipeptidică a procolagenului

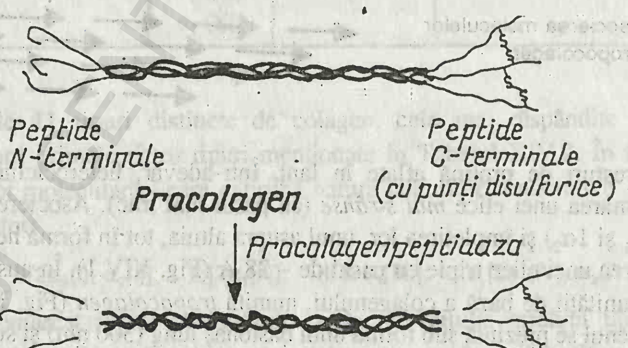


Fig. XIV.4 - Transformarea procolagenului în tropocolagen

După cum se observă în Fig. XIV.4, odată cu îndepărtarea celor trei peptide N-terminale (fiecare având masa de aproximativ 15 kD), se îndepărtează şi trei peptide de la capetele C-terminale (fiecare cu masa de aproximativ 30 kD). Regiunile C-terminale ale celor trei lanţuri α cuprind legături disulfidice intercatenare. Ulterior, moleculele de tropocolagen rezultate se autoasamblează în *microfibrile* care se dispun paralel, fiind stabilizate prin legături covalente, încrucişate.

Formarea legăturilor încrucişate din microfibrile necesită parcurgerea următoarelor 4 categorii de procese extracelulare (Fig. XIV.5):

(1) oxidarea unor resturi de lizină şi hidroxilizină la aldehidele corespunzătoare (alizină şi hidroxializină) sub acţiunea enzimei numită colagen - lizin oxidaza care este inactivă faţă de aminoacizii respectivi când se află în stare liberă;

(2) condensarea aldehidelor formate cu resturi de lizină conducând la bazele Schiff corespunzătoare;

(3) condensări (aldolică şi crotonică) a doua resturi de aldehidă;

(4) condensarea, de tip crotonic, a aldehidei cu resturi de histidină.

Datorită acestor legături încrucişate inter- şi intramoleculare, fibrilele de colagen capătă o mare rezistenţă mecanică. Este de remarcat că odată cu înaintarea în vârstă numărul legăturilor încrucişate creşte. Pe de altă parte, diversele tipuri de colagen (Tabel XIV.2) se deosebesc între ele şi prin numărul legăturilor încrucişate precum şi prin grosimea fibrelor. Astfel, colagenul de tip I este constituit din fibre mai groase care au un conţinut mai redus de hidroxilizină şi glucide.

Mai multe microfibrile de colagen, vizibile numai la microscopul electronic, se asociază constituind fibrele de colagen, vizibile la microscopul optic. În fond, din punct de vedere al compoziţiei şi structurii sale, fibrila de colagen este produsul final al unei agregări proprii - bine cunoscute şi controlate - de aminoacizi dispuşi în anumite secvenţe.

Din reunirea mai multor fibrile rezultă fibra de colagen (Fig. XIV.6.)

Este de remarcat că deşi biosinteza colagenului decurge în acelaşi fel în toate ţesuturile (parcurgându-se cele 10 etape menţionate anterior), microfibrilele rezultate se dispun în mod deosebit în diverse organe. Astfel, în tendoane formaţiunile fibrilare (microfibrile, fibrile) sunt dispuse în mănunchiuri paralele; în piele microfibrilele sunt orientate într-un acelaşi plan iar în cartilaje ele sunt asociate cu proteoglicani, astfel încât nu se mai pot recunoaşte microfibrilele individuale. O altă deosebire importantă în cazul colagenului din diverse organe sau ţesuturi se referă la diametrul microfibrilelor: el este de 150-250 A în cartilaje, 300 A în cornee, 600 A în piele şi 300-1200 A în tendoane. De asemeni, odată cu înaintarea în vârstă, diametrul microfibrilelor de colagen din diverse ţesuturi creşte apreciabil, putând ajunge până la valoarea maximă de 2000 A.

b) *Colagenoliza.* Colagenul izolat din diverse ţesuturi se reînnoieşte în perioade variabile de timp, în funcţie de organul căruia aparţine. Astfel, studiile cu izotopi radioactivi - făcute pe şobolani - au dovedit că timpul de înjumătăţire al colagenului din piele este de 200 zile, al celui din muşchi de 60 zile şi al celui din ficat de 30 zile. Se cunosc şi situaţii în care colagenul se degradează şi se reînnoieşte mult mai repede; spre exemplu, în involuţia uterului după naştere şi în vindecarea rănilor. Indiferent de ritmul de reînoire, în procesele fiziologice normale există un echilibru foarte bine păstrat între biosinteza colagenului şi degradarea lui. Această degradare se mai numeşte colagenoliză şi are loc sub acţiunea unor enzime hidrolitice numite colagenaze. Colagenazele sunt secretate de către celulele ţesutului conjunctiv sub formă inactivă, de procolagenaze. În mediul extracelular ele sunt activate şi îşi exercită acţiunea hidrolitică.

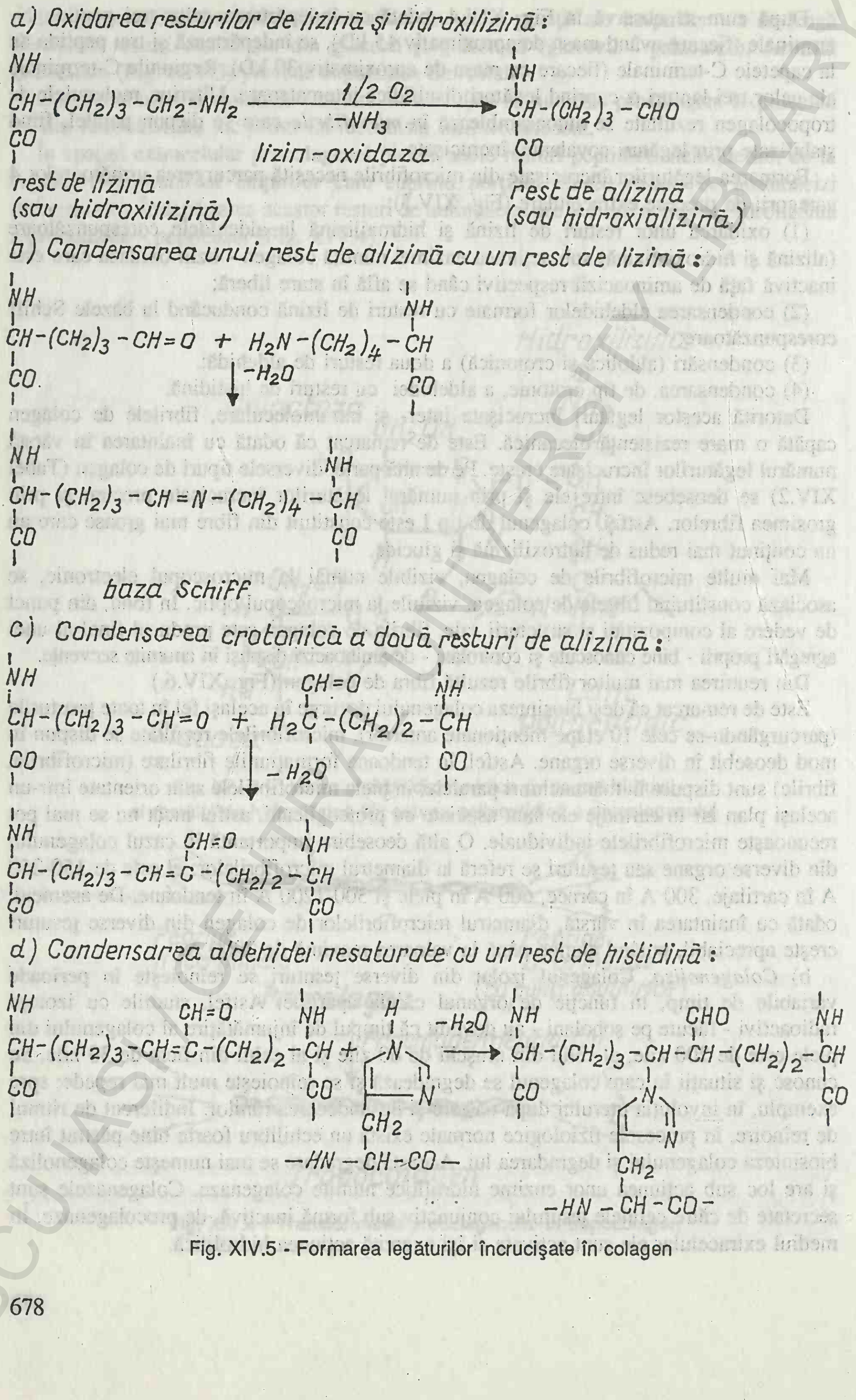


Fig. XIV.5 - Formarea legăturilor încrucişate în colagen

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

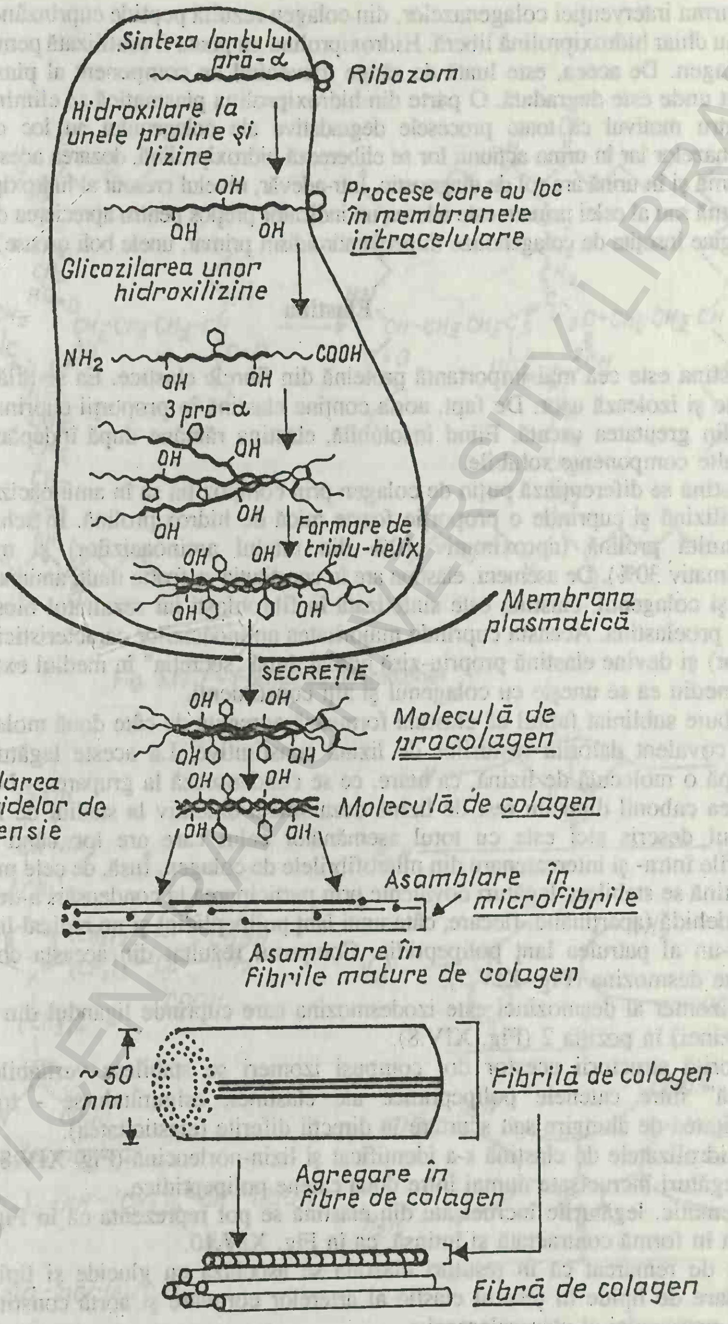


Fig. XIV.6 - Schema principalelor procese inter- şi extracelulare implicate în formarea fibrelor de colagen

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În urma intervenţiei colagenazelor, din colagen rezultă peptide cuprinzând hidroxiprolina sau chiar hidroxiprolină liberă. Hidroxiprolina nu poate fi reutilizată pentru biosinteza de colagen. De aceea, este luată de sânge (devenind un component al plasmei) şi dusă la ficat unde este degradată. O parte din hidroxiprolina plasmatică se elimină prin urină.

Pentru motivul că toate procesele degradative ale colagenului au loc cu intervenţia colagenazelor iar în urma acţiunii lor se eliberează hidroxiprolină, dozarea acestui aminoacid în plasmă şi în urină are rol de diagnostic. Într-adevăr, nivelul crescut al hidroxiprolinei libere în plasmă sau al celei urinare este adesea un indicator preţios pentru aprecierea diverselor stări patologice însoţite de colagenolize (hiperparatiroidism primar, unele boli osoase).

Elastina

Elastina este cea mai importantă proteină din fibrele elastice. Ea se află în aortă, de unde se şi izolează uşor. De fapt, aorta conţine elastină în proporţii cuprinse între 30 şi 57% din greutatea uscată. Fiind insolubilă, elastina rămâne după îndepărtarea tuturor celorlalte componente solubile.

Elastina se diferenţiază puţin de colagen prin compoziţia sa în aminoacizi; nu conţine hidroxilizină şi cuprinde o proporţie foarte mică de hidroxiprolină. În schimb, conţine mai multă prolină (aproximativ 10% din totalul aminoacizilor) şi multă glicină (aproximativ 30%). De asemeni, elastina are în constituţia sa foarte mulţi aminoacizi nepolari.

Ca şi colagenul, elastina este sintetizată în fibroblaşti iar rezultatul biosintezei este, iniţial, proelastina. Aceasta cuprinde majoritatea aminoacizilor caracteristici (menţionaţi anterior) şi devine elastină propriu-zisă numai după "secreţia" în mediul extracelular. În acest mediu ea se uneşte cu colagenul şi alţi constituenţi.

Trebuie subliniat faptul că elastina formează agregate de câte două molecule care se unesc covalent datorită resturilor de lizină constitutive. La aceste legături covalente participă o moleculă de lizină, ca atare, ce se condensează la gruparea - NH_2 liberă cu gruparea cabonil dintr-un rest de lizină dezaminată oxidativ la stadiul de lizilaldehidă. Procesul descris aici este cu totul asemănător celui care are loc când se stabilesc legăturile întra- şi intercatenare din microfibrilele de colagen. Însă, de cele mai multe ori, în elastină se stabilesc legături covalente prin participarea la condensări a trei radicali de lizil-aldehidă (aparţinând, fiecare, câte unui lanţ polipeptidic) şi un radical lizil - ca atare - dintr-un al patrulea lanţ polipeptidic. Compusul rezultat din aceasta condensare se numeşte desmozina (Fig. XIV.7).

Un izomer al desmozinei este izodesmozina care cuprinde ligandul din poziţia 4 (a desmozinei) în poziţia 2 (Fig. XIV.8).

Datorită structurii acestor doi compuşi izomeri se stabilesc veritabile "punţi de legătură" între catenele polipeptidice ale elastinei, asigurându-se - totodată - şi posibilitatea de alungire sau scurtare în direcţii diferite (elasticitatea).

În hidrolizatele de elastină s-a identificat şi lizin-norleucină (Fig. XIV.8) care poate creia legături încrucişate numai între două catene polipeptidice.

Schematic, legăturile încrucişate din elastină se pot reprezenta ca în Fig. XIV.9 iar elastina în formă contractată şi întinsă, ca în Fig. XIV.10.

Este de remarcat că în ţesuturi elastina se asociază cu glucide şi lipide. Această acumulare de lipide în ţesutul elastic al arterelor coronare şi aortă constitue unul din factorii patogenici ai aterosclerozei.

Ca şi colagenul, elastina este degradată prin hidroliză enzimatică. Hidrolaza corespunzătoare acestui proces se numeşte elastază.

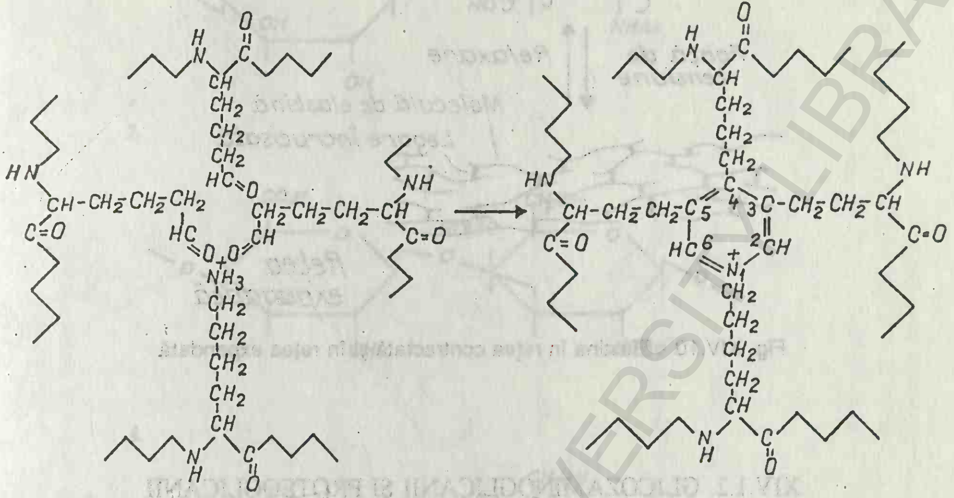
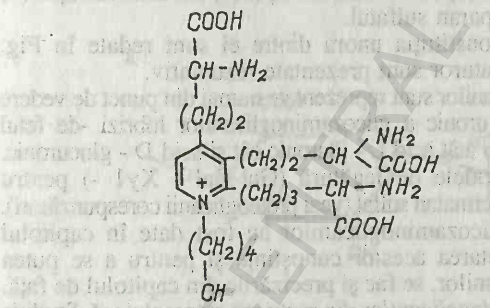
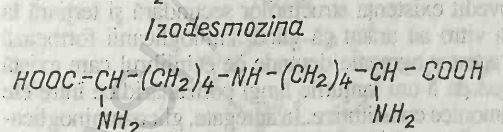


Fig. XIV.7 - Formarea desmozinei



Izodesmozina



Lizin-norleucina

Fig. XIV.8 - Izodesmozina şi lizin-norleucina

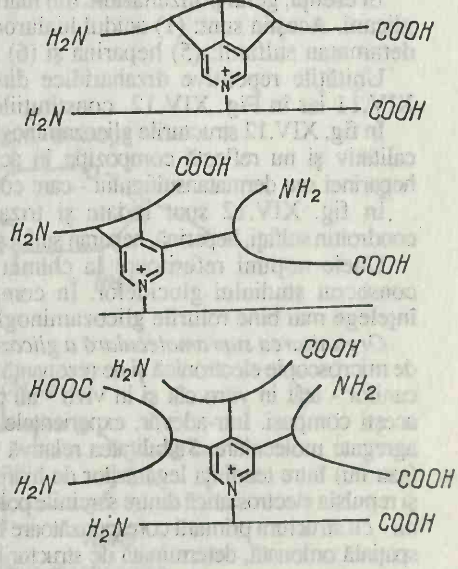


Fig. XIV.9 - Conexiuni între lanţurile polipeptidice ale elastinei

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

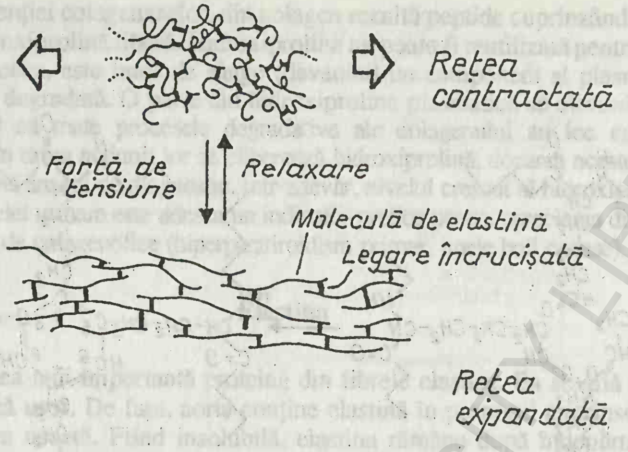


Fig. XIV.10 - Elastina în rețea contractată și în rețea expandată

XIV.1.2. GLICOZAMINOGLICANII ŞI PROTEOGLICANII

Glicozaminoglicanii

În esență, gelul polizaharidic din matricea extracelulară este constituit din glicozaminoglicani. Aceştia sunt: (1) acidul hialuronic, (2) condroitin sulfaţii; (3) keratan sulfaţii; (4) deramatan sulfatul; (5) heparina şi (6) heparan sulfatul.

Unităţile repetitive dizaharidice din constituţia unora dintre ei sunt redate în Fig. XIV.11 iar în Fig. XIV.12 constituţiile tuturor sunt prezentate rezumativ.

În fig. XIV.12 structurile glicozaminoglicanilor sunt reprezentate numai din punct de vedere calitativ şi nu reflectă compoziţia în acid uronic a glicozaminoglicanilor hibrizi -de felul heparinei sau dermatansulfatului - care conţin atât acid L - iduronic cât şi acid D - glucuronic. În fig. XIV.12 sunt redate şi trizaharidele de legătură (Gal-Gal - Xy1 -) pentru condroitin sulfaţi, heparină, heparan sulfat şi dermatan sulfat (vezi proteoglicanii corespunzători).

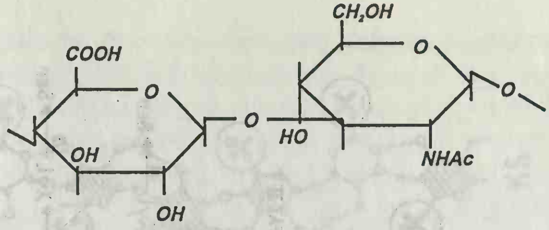
Unele noţiuni referitoare la chimia glicozaminoglicanilor au fost date în capitolul consacrat studiului glucidelor. În completarea acestor cunoştinţe şi pentru a se putea înţelege mai bine rolurile glicozaminoglicanilor, se fac şi precizările din capitolul de faţă.

Organizarea supramoleculară a glicozaminoglicanilor din matricea extracelulară. Studiile de microscopie electronică şi de rezonanţă magnetică nucleară efectuate asupra glicozaminoglicanilor - atât in vitro cât şi in vivo - au dovedit existenţa structurilor secundară şi terţiară la aceşti compuşi. Într-adevăr, experienţele in vitro au arătat că glicozaminoglicanii formează agregate moleculare. Stabilitatea relativă a acestor agregate depinde de echilibrul care există (sau nu) între tendinţa legăturilor de hidrogen de a uni lanţurile lungi polizaharidice între ele şi repulsia electrostatică dintre sarcinile polianionice constitutive. În agregate, glicozaminoglicanii - cu structura primară corespunzătoare lanţurilor polizaharidice caracteristice - au şi o aşezare spaţială ordonată, determinată de structurile lor secundară şi terţiară.

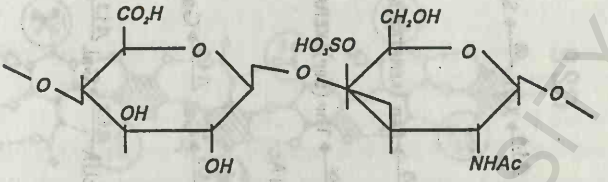
Structura secundară a glicozaminoglicanilor corespunde, pentru fiecare în parte, câte unei elice duble (dublu helix). Astfel, în Fig. XIV.13 sunt prezentate structurile secundare - de elice duble - pentru condroitin-6-sulfat şi keratansulfat.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

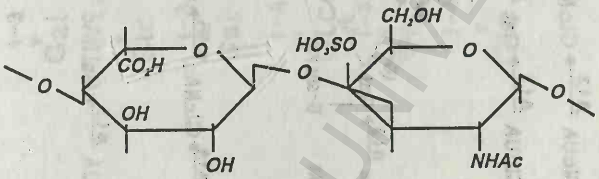
1.



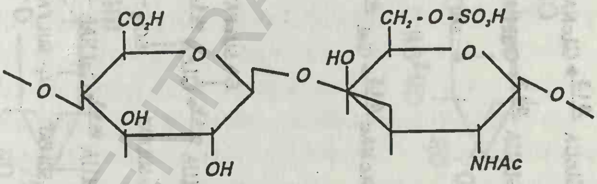
2.



3.



4.



5.

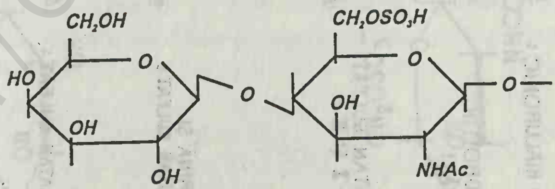


Fig. XIV.11 - Unitățile repetitive dizaharidice din constituția glicozaminoglicanilor
1. acid hialuronic, 2. condroitin-4 sulfat, 3. dermatan sulfat, 4. condroitin-6-sulfat, 5. keratan sulfat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

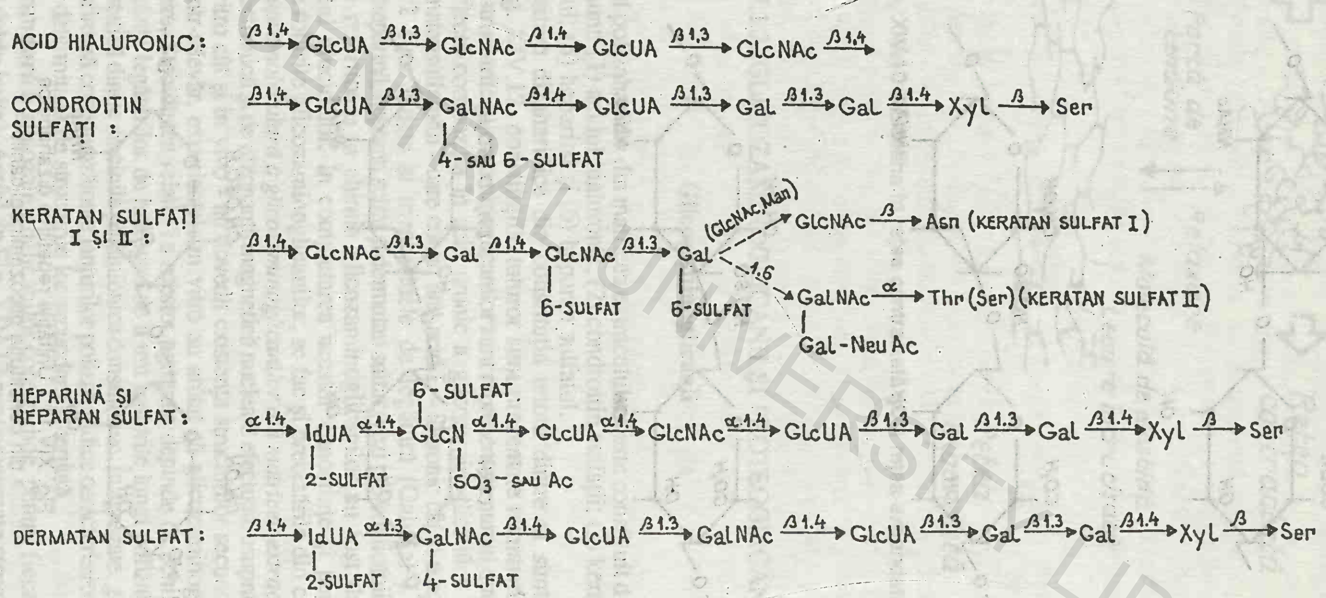


Fig. XIV.12 - Structura chimică a glicozaminoglicanilor şi proteoglicanilor.
GlcUA = acid glucuronic, IdUA = acid iduronic, GlcN = D-glucozamina, GalN = D-galactozamina, Ac = acetil, , Gal = D-galactoza, Xyl = xiloza, Ser = L-serina, Thr = treonina, Asn = L-asparagina, Man = D-manoza, NeuAc = acid N-acetilneuraminic

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

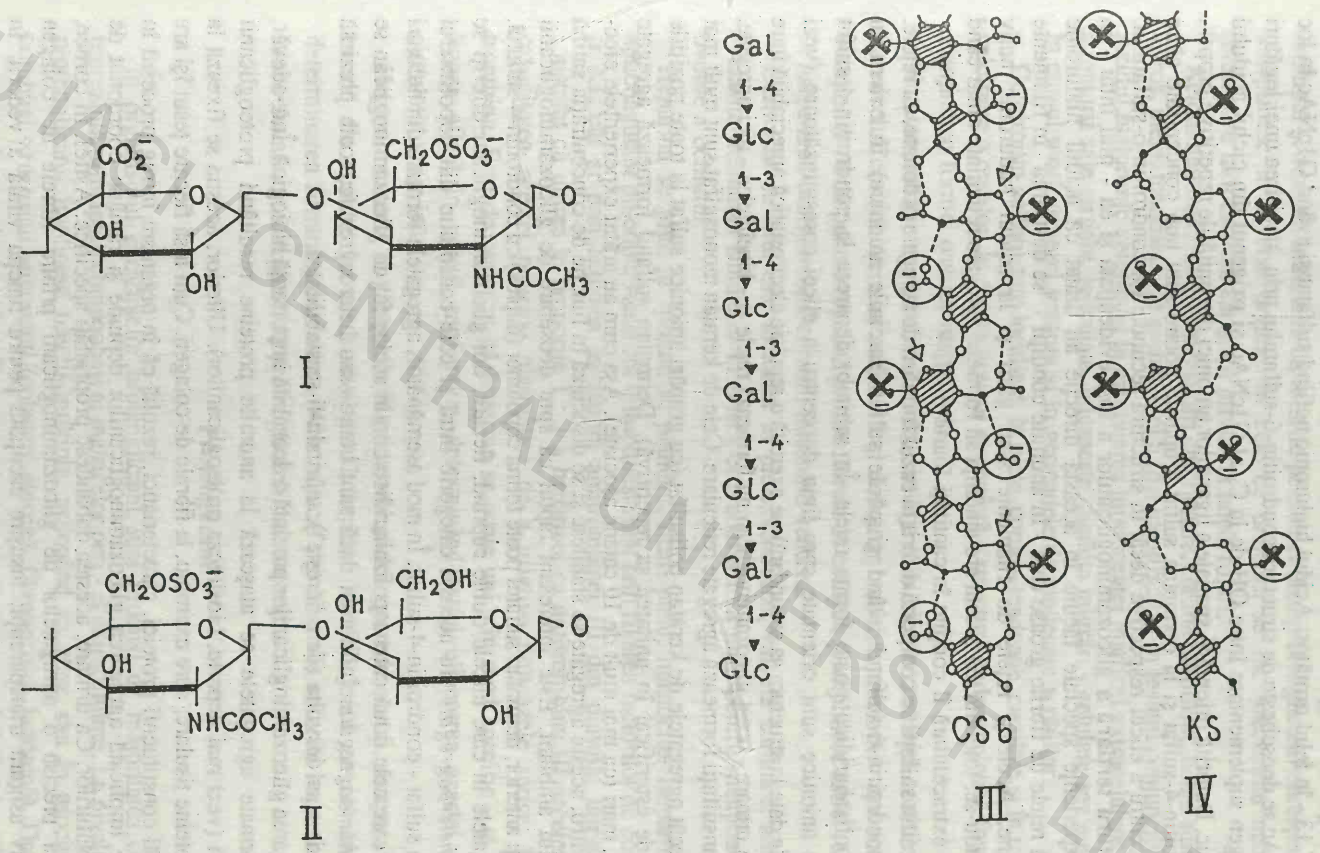


Fig. XIV.13 - Unităţile dizaharidice repetitive (I,II), structurile primară şi secundară ale condroitin-6-sulfatului (III) şi keratan sulfatului (IV). Regiunile anionice (⊗) sunt reprezentate de grupările ester sulfat şi carboxil. Ele sunt aşezate în poziţii echivalente la cele două elice. Regiunile hidrofobe (haşurate) sunt şi ele aşezate în poziţii echivalente la cele două elice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structurile secundare ale celorlalţi glicozaminoglicani diferă - de cele prezentate în Fig. XIV.13 - în felul următor: Acidul hialuronic nefiind sulfatat şi având GlcNAc în loc de GalNAc se deosebeşte de structura condroitin-6-sulfatului prin stabilirea unei legături de hidrogen suplementare între OH de la C_4 al GlcNAc şi oxigenul din ciclul acidului glucuronic. Datorită orientării spaţiale a liganzilor anionici din unităţile repetitive proprii, la condroitin-4-sulfat şi la dermatan sulfat grupările polare sunt mai concentrate către linia de centru a elicei respective decât în structura secundară a condroitin-6-sulfatului.

Structura terţiară a glicozaminoglicanilor a fost evidenţiată şi ea - mai întâi - in vitro. Experienţe speciale făcute în această direcţie au arătat că acidul hialuronic formează reţele de fibrile groase care - în anumite condiţii - "se destramă" în filamente foarte fine. Aceleaşi reţele de filamente s-au găsit şi la acidul hialuronic nativ constatându-se, totodată, că acesta are tendinţa să formeze agregate reticulate chiar când matricea extracelulară îl conţine în cantităţi foarte mici.

Condroitin sulfaţii se comportă diferit în cazul formării de agregate ordonate, ca reţele. Astfel, condroitin-6-sulfatul având grupările sulfat (sarcinile anionice) în exteriorul catenei polizaharidice poate forma reţele. În schimb, deoarece la condroitin-4-sulfat grupările anionice sunt orientate spre linia de centru a elicei corespunzătoare (vezi explicaţiile date la structura sa secundară), se exercită o repulsie electrostatică apreciabilă între ele şi - ca urmare - acest glicozaminoglican nu formează reţele şi - bineînţeles - nici agregate.

Keratansulfaţii formează agregate reticulare. Cele de keratan monosulfat sunt mult mai stabile decât agregatele de keratan polisulfat (cu grupări anionice sulfat la toate poziţiile posibile de esterificat în unitatea sa repetitivă). Dermatan sulfatul formează agregate ordonate, mari (cu mai mult de 10 catene asociate). Aşa cum au arătat experienţele efectuate in vitro, aceste agregate se stabilesc şi se disociază în funcţie de concentraţia salină a mediului ambiant. Este interesant faptul că spre deosebire de glicozaminoglicanii menţionaţi anterior, dermatan sulfatul poate forma copolimer (duplex) cu condroitin-4-sulfatul.

Agregatele în care elicele duble cuprind, fiecare, doi glicozaminoglicani diferiţi se numesc *heteroagregate*. În această categorie intră şi cele constituite din copolimerul dermatan sulfat - condroitin-4-sulfat. În mod asemănător, agregatele formate din helixuri duble în care cele două catene polizaharidice conţin acelaş fel de glicozaminoglican se numesc *homoagregate*. Indiferent dacă sunt homo- sau heteroagregate, toate prezintă tendinţa de a se desvolta (de a "creşte"), mărindu-li-se stabilitatea.

Agregarea glicozaminglicanilor prezintă o deosebită importanţă biologică. Într-adevăr, odată formate agregatele se ataşează la anumite proteine rezultând proteoglicanii respectivi (vezi mai departe, biosinteza proteoglicanilor). Ulterior, aceştia se fixează la unele proteine tisulare; spre exemplu, la fibrele de colagen. Cum însă fiecare ţesut îşi are proprii săi constituenţi proteici, caracteristici, rezultă că în organism întreg procesul în care este implicată agregarea glicozaminoglicanilor depinde şi rămâne coordonat de natura ţesuturilor. Ca urmare, acestea dobândesc proprietăţi specifice. Astfel, în cornee, ordonarea precisă a agregatelor de glicozaminoglicani printre fibrele de colagen constitutiv asigură transparenţa; însuşire esenţială pentru funcţia vitală a vederii. În agregatele de la nivelul corneii au fost evidenţiate heteroduplexuri foarte stabile constituite din condroitin sulfat şi keratan sulfat.

Localizarea glicozaminglicanilor şi rolurile lor. Localizarea glicozaminglicanilor este multiplă şi variată, în funcţie de rolurile pe care ei (sau proteoglicanii corespunzători) le îndeplinesc în diverse organe. În cele ce urmează se fac precizările necesare atât referitoare la localizare cât şi cu privire la unele roluri.

Acidul hialuronic se află în ţesuturi embrionare, cordon ombilical, lichid sinovial, corp vitros, piele, tendoane. De asemeni, el a fost identificat şi în ţesutul conjunctiv degradat. Acidul hialuronic contribuie la menţinerea turgescenţei matricei extracelulare şi datorită structurii sale terţiare, reticulate, înlesneşte anumite migrări - celulare sau subcelulare - în cursul morfogenezei precum şi în perioadele de vindecare a rănilor.

Condroitin sulfaţii sunt localizaţi în piele, cornee, tendoane, cartilaje şi în regiunile de calcifiere a oaselor. În aceste regiuni ei conferă o structură endoscheletică foarte utilă în menţinerea formei oaselor respective.

Keratan sulfaţii se găsesc în cornee, cartilaje (mai ales în cartilajul costal) şi în oase. La nivelul corneii, keratan sulfatul I şi dermatan sulfatul prezintă - aşa cum s-a mai menţionat - o dispunere regulată printre fibrele de colagen şi împlinesc astfel rolul decisiv în asigurarea transparenţei corneii, înlesnind vederea.

Dermatan sulfatul este localizat în piele, tendoane, valvele cardiace, aortă, scleră. Prezenţa dermatan sulfatului în scleră este considerată utilă pentru menţinerea formei ovoide a ochiului.

Heparina se află, în special, în plămâni, ficat, piele, mastocite. Heparina este un anticoagulant puternic. Acest rol îl implineşte atât prin fixarea factorilor de coagulare IX şi XI, cât şi prin acţiunea sa asupra antitrombinei III din plasmă. Într-adevăr, s-a constatat că unirea în proporţie 1 : 1 a heparinei cu antitrombina III accelerează mult capacitatea acestei proteine plasmatice de a inactiva proteazele serice; în special, trombina. Este de remarcat că heparina se poate uni - în mod specific - şi cu protein lipaza aflată în pereţii capilarelor, determinând astfel eliberarea acestei enzime în circulaţia sangvină.

Heparan sulfatul se găseşte în fibroblastele pielei, peretele aortei, sinapse, membrana bazală din rinichi. La acest nivel renal, heparan sulfatul joacă un rol important în determinarea filtrării glomerulare. Alte aspecte privitoare la rolurile heparan sulfatului sunt relevate, mai departe, la proteoglicanii care-l conţin.

Proteoglicanii

În organismul eucariotelor proteoglicanii sunt produşi de majoritatea celulelor şi reprezintă principalii componenţi ai matricelor peri - şi extracelulare. La nivelul acestora proteoglicanii împlinesc funcţii multiple, acţionând ca atare sau în asociere cu alţi compuşi structurali importanţi (colagen, elastină, fibronectină, laminină). Datorită unor asemenea interacţiuni, proteoglicanii sunt consideraţi ca cei mai determinanţi factori de organizare ai matricei extracelulare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din punct de vedere constituţional, preteoglicanii conţin câte o proteină centrală (miezul proteic) pe care sunt fixate foarte numeroase catene de glicozaminoglicani. (Fig. XIV. 14).

În majoritatea cazurilor, numărul lanţurilor poliglicanice fixate pe miezul proteic variază între 2 şi 60, în funcţie de numărul resturilor de hidroxiaminoacizi din catena polipeptidică respectivă. Într-adevăr, la nivelul unor asemenea hidroxiaminoacizi se fixează, prin legături O-glicozidice, trizaharidele (Xyl-Gal-Gal) care ataşează - în fiecare proteoglican - la proteina centrală glicozaminoglicanii corespunzători (Fig. XIV 15). Însă, aşa cum se observă şi în Fig. XIV 15, ataşarea glicozaminoglicanilor se poate face şi prin N-legătură la resturi de acid aspartic (sau asparagină) din catena polipeptidică.

Tot din Fig. XIV. 15 reiese că pentru keratan sulfat există ambele modalităţi de legătură la proteina centrală: legătură O-glicozidică (identificată în cartilaje) şi N-legătură (evidenţiată în cornee).

Pe de altă parte, proteoglicanii diferă între ei prin lungimea lanţurilor glicanice precum şi prin gradul lor de sulfatare. Datorită acestui fapt, proprietăţile proteoglicanilor variază în funcţie de natura catenelor sulfatate. Cu alte cuvinte, fiecare catenă sulfatată - într-o anume măsură şi cu o secvenţă bine determinată a grupărilor sulfat - are proprietăţi specifice şi îndeplineşte funcţii caracteristice. Trebuie însă remarcat că structura proteoglicanilor este susceptibilă de modificări apreciabile. Totdeauna, aceste modificări sunt în raport direct cu rolurile biologice care trebuie împlinite.

Ţinându-se seama de faptul că glicozaminoglicanii care intră în constituţia proteoglicanilor au fost descrişi anterior atât din punct de vedere al compoziţiei lor chimice cât şi al funcţiilor biologice, în cele ce urmează se vor releva numai unele aspecte - foarte noi - referitoare la structura şi rolurile proteoglicanilor.

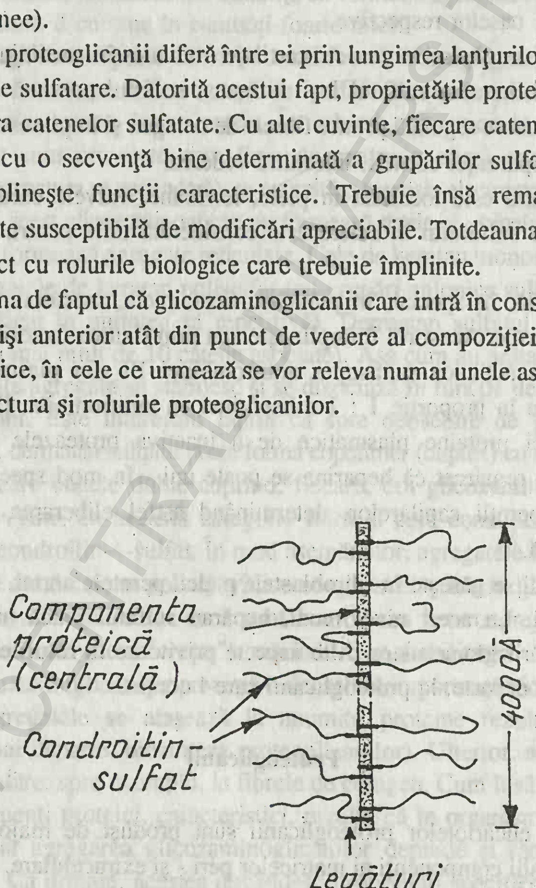


Fig. XIV.14 — Schema dispunerii lanţurilor de condroitin sulfat pe componenta proteică într-un proteoglican care conţine acest glicozaminoglican.

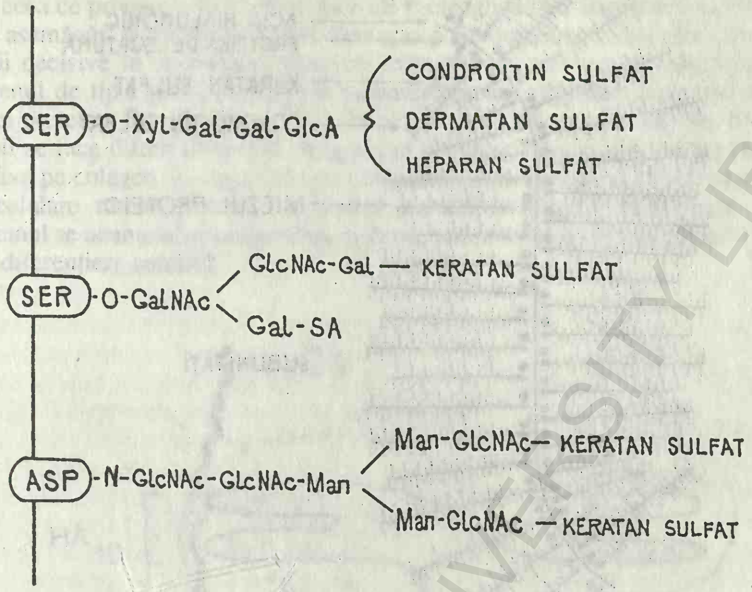


Fig. XIV. 15 - Legăturile glicozaminoglicanilor constitutivi cu miezul proteic în diverşi proteoglicani

I) Proteoglicani cu rol în organizarea matricei extracelulare

a) *Agrecanul*

Cel mai reprezentativ proteoglican din această categorie şi - totodată - cel mai bine cunoscut este agrecanul. De fapt, agrecanul este numele generic dat întregei categorii de proteoglicani fiind constituit dintr-un număr enorm de agregate multimoleculare care conţin - la rândul lor - foarte mulţi monomeri proteoglicanici, fixaţi necovalent la hialuronan (echivalentul proteoglicanic al acidului hialuronic).

În Fig. XIV. 16 este prezentată structura unui singur agregat de proteoglicani iar în Fig. XIV 17 sunt arătate (şi explicate) interacţiile care au loc la formarea unui agrecan.

Agrecanul se află, în special, în cartilaje; de unde a fost izolat şi analizat. S-a stabilit astfel că agrecanul izolat din cartilaje - aflate în organismul omului şi al câinelui - are un miez proteic cu greutatea moleculară cuprinsă între 225 şi 250 kD. De asemeni, prin analize multiple s-a ajuns să se cunoască şi secvenţele de aminoacizi din acest miez proteic. Pe de altă parte, s-a constatat că aproape 90% din masa unui agrecan este de natură glucidică, formată - în majoritate - din catene de condroitin sulfaţi dar include şi catene de keratan sulfat precum şi oligozaharide de legătură (cu O - sau N- legătură). Catenele de condroitin sulfat sunt fixate la dipeptide care cuprind secvenţe Ser - Gly şi se află în regiunea centrală a miezului proteic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

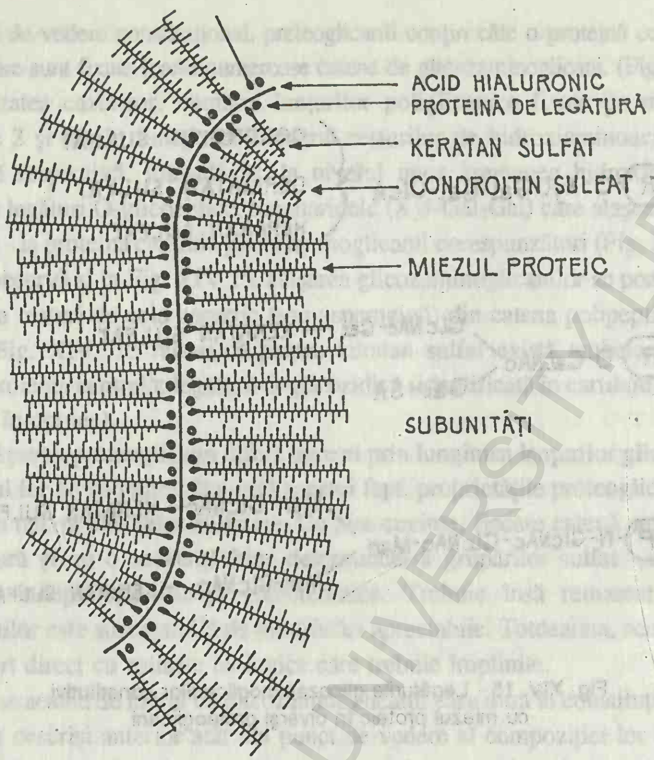


Fig. XIV. 16 - Reprezentarea schematică a unui agregat de proteoglicani

Principala funcţie biologică a agrecanului constă în distribuirea sarcinilor la nivelul joncţiunilor care sunt supuse la greutăţi apreciabile.

b) *Proteoglicani bogaţi în leucină*

În ţesutul conjunctiv din diverse organe s-a constatat că sunt distribuiţi - cu precădere - trei proteoglicani cu greutate moleculară mică şi la care componenta proteică respectivă este bogată în leucină. Aceşti proteoglicani sunt: *biglicanul*, *decorina* şi *fibromodulina*. Biglicanul şi decorina conţin, fiecare, una sau două catene de condroitin sulfat sau dermatan sulfat fixate la capătul N-terminal ($-NH_2$) al proteinei centrale. Fibromodulina cuprinde mai multe catene de keratan sulfat, fixate prin N-legătură, la regiunea centrală a miezului proteic, bogată în resturi de leucină (Fig. XIV. 18).

La decorină şi biglican proteinele lor centrale conţin câte 12 unităţi repetitive, dispuse consecutiv şi constituite din 24 resturi de aminoacizi. Printre aceştia se găsesc multe resturi de leucină, plasate în poziţii fixe. Secvenţele homoloage din fibromodulină conţin 10 unităţi repetitive formate din 23 aminoacizi. Pe de altă parte, la aceşti trei proteoglicani aminoacizii terminali ai miezului proteic sunt diferiţi. De aceea, şi legăturile glicozaminoglicanilor cu lanţul polipeptidic se deosebesc în aceste regiuni extreme. Într-adevăr, la decorină şi biglican ataşarea catenelor glicanice respective se face prin O-legătură deoarece lanţurile polipeptidice au la extreme hidroxiaminoacizi. În schimb, la fibromodulină nu

există această situaţie şi de aceea catenele de keratan sulfat se unesc prin N-legătură, la regiunea centrală - bogată în leucină - a miezului proteic.

În ceea ce priveşte rolurile biologice ale proteoglicanilor bogaţi în leucină se constată unele asemănări şi deosebiri. Astfel, decorina şi fibromodulina sunt considerate ca având funcţii decisive în organizarea matricei extracelulare pentru motivul că fixarea lor pe colagenul de tip I şi II determină întârzierea formării fibrilelor şi a fibrelor subţiri ale acestei proteine. Este de remarcat că fixarea fibromodulinei pe colagenul din constituţia corneii se face diferit de modul de fixare al decorinei. Biglicanul nu are capacitatea de a se fixa pe colagen şi - de aceea - se consideră că intervenţia sa în organizarea matricei extracelulare nu se exercită la nivelul asamblării fibrelor de colagen. În schimb, biglicanul se acumulează la suprafaţa şi în preajma celulelor fiind implicat în morfogeneză şi diferenţiere celulară.

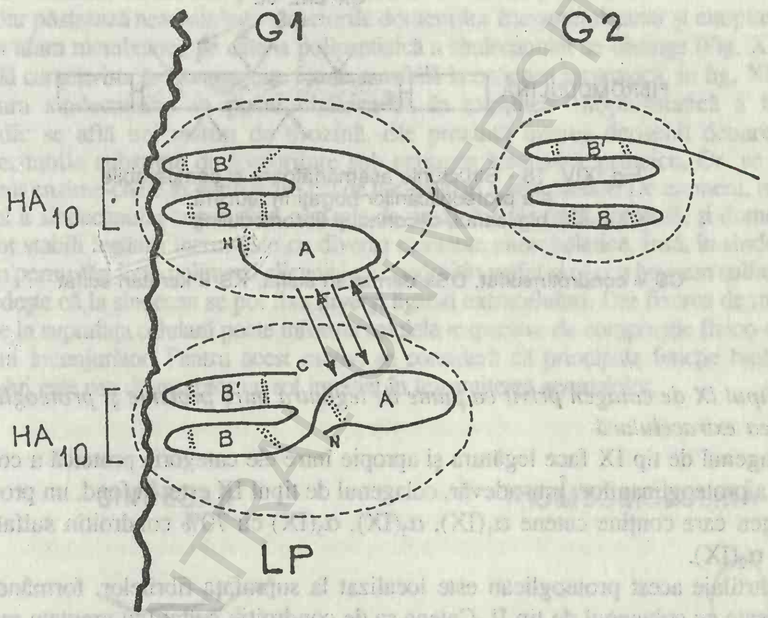


Fig. XIV. 17 - Interacţiile implicate în alcătuirea unui agrecan. Domeniul G_1 al agrecanului reprezintă o regiune de legătură la hialuronan. Acest domeniu conţine o imunoglobină (A) urmată de proteoglican repetat (buclele B şi B'). Un aranjament similar - dar proteic în totalitate - se regăseşte în proteina de legătură (L.P.). Ambele formaţiuni, domeniul G_1 şi proteina de legătură, se fixează la o unitate dizaharidică, repetată (HA_{10}) din hialuronan. Se remarcă în figură şi unirea domeniului G_1 cu proteina de legătură (L.P.) prin interacţiunea existentă între buclele imunoglobulinelor respective. Domeniul G_2 al agrecanului conţine şi el bucle repetate de proteoglican dar acestea nu au proprietatea de a se uni cu hialuronanul. Fiecare agregat conţine o singură catenă de hialuronan (cu greutatea moleculară $0,5\text{-}1\cdot10^6$ D) şi are ataşate circa 100 agrecani şi molecule proteice de legătură (masa totală $\approx 200\cdot10^6$ D).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

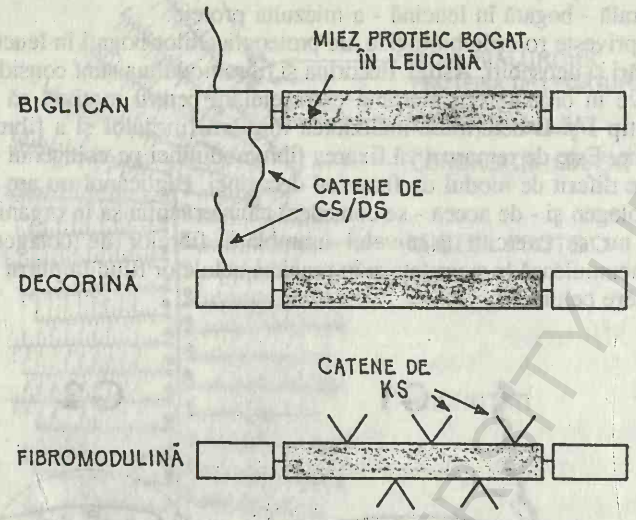


Fig. XIV. 18 - Structurile asemănătoare şi comparabile ale proteoglicanilor bogaţi în leucină: biglicanul, decorina şi fibromodulina

CS = condrotinsulfat, DS= dermatan sulfat, KS = keratan sulfat

c) *Tipul IX de colagen privit ca punte de legătură între proteine şi proteoglicanii din matricea extracelulară*

Colagenul de tip IX face legătura şi apropie între ele categoria proteică a colagenilor de cea a proteoglicanilor. Într-adevăr, colagenul de tipul IX este, în fond, un proteoglican heterogen care conţine catene α_1(IX), α_2(IX), α_3(IX) cu 70% condroitin sulfat fixat pe catena α_2(IX).

În cartilaje acest proteoglican este localizat la suprafaţa fibrilelor, formând legături încrucişate cu colagenul de tip II. Catena sa de condroitin sulfat (cu greutate moleculară ~ 40 kD) este ataşată la un rest de serină care face parte dintr-o secvenţă de 5 aminoacizi, Val - Glu - Gly - Ser - Ala (Asp), din catena α_2 (IX). Colagenul de tip IX se află şi în corpul vitros al ochiului dar diferă de cel care se găseşte în cartilaje atât prin structura primară a componentei proteice cât şi prin componenta glicanică. De asemeni, catena proteică centrală a colagenului de tip IX din corpul vitros este mai scurtă decât a celui din cartilaje iar condroitin sulfatul corespunzător are o masă moleculară de aproximativ 350 kD; deci de cca 10 ori mai mare decât la colagenul IX din cartilaje. Studiile de microscopie electronică au relevat faptul că fibrilele de colagen din corpul vitros sunt mult mai ataşate de glicozaminoglicani decât în cartilaje. Aşa cum s-a mai menţionat, o asemenea dispunere spaţială se consideră a fi absolut necesară pentru optimizarea transmisiei luminii prin matrice şi pentru păstrarea structurii globulare a ochiului.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. Proteoglicani cu rol la suprafaţa celulară

a) *Sindecanul*

Sindecanul reprezintă o familie de proteoglicani aflaţi la suprafaţa polimorfă celulară. Ei conţin catene glicanice de heparan sulfat sau de condroitin sulfat. Ca structură, la sindecan se poate observa: (1) un domeniu restrâns citoplasmatic, cuprinzând capătul C-terminal de la catena polipeptidică respectivă, (2) o regiune transmembranară, conţinând - în continuare - o porţiune din miezul proteic şi (3) ectodomeniul care este regiunea mare (25 kD) aflată de cealaltă parte a membranei şi care cuprinde tot restul miezului proteic împreună cu catenele de glicozaminoglicani (condroitin sulfat sau heparan sulfat) fixate pe el (Fig. XIV. 19).

Este de remarcat că familia proteoglicanică de sindecan poate avea mai multe forme proteice dar păstrează neschimbate structurile domeniilor transmembranar şi citoplasmatic. Imediat în afara membranei, pe catena polipeptidică a sindecanului se distinge (Fig. XIV. 19) o dipeptidă caracteristică. Aceasta este foarte sensibilă la acţiunea proteazică. În fig. XIV. 19, la structura sindecanului se poate observa că în regiunea citoplasmatică a lanţului polipeptidic se află trei resturi de tirozină. Ele prezintă interes deosebit deoarece pot deveni veritabile substrate de fosforilare sub acţiunea kinazelor proteice. Or, se ştie că acestea sunt enzime-cheie în numeroase căi de transmitere a semnalelor. De asemeni, regiunea din citosol a sindecanului cuprinzând resturile de tirozină reprezintă, totodată, şi domeniul în care se pot stabili legături încrucişate cu diverse elemente citoscheletice. Însă, în sindecan au loc adesea permutări între polimerii glicanici cu condroitin sulfat şi cei cu heparan sulfat. Acest fapt dovedeşte că la sindecan se pot fixa diverşi liganzi extracelulari. Dar fixarea de molecule matriceale la suprafaţa celulară poate informa celulele respective de compoziţie fizico-chimică a mediului înconjurător. Pentru acest motiv, se consideră că principala funcţie biologică a sindecanului este cea de receptor cu rol imediat în transmiterea semnalelor.

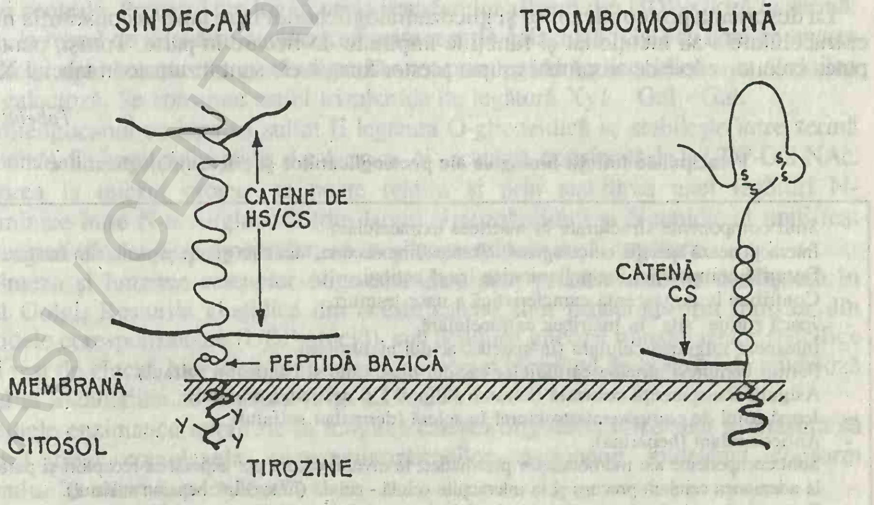


Fig. XIV. 19 - Proteoglicanii de la suprafaţa celulară: sindecanul şi trombomodulina.

b) *Trombomodulina*

Trombomodulina se poate afla atât în formă de proteoglican cât şi ca neproteoglican. Când s-a indentificat forma sa de proteoglican, i s-au studiat proprietăţile biologice ale ambelor componente: proteină şi glicozaminoglican. S-a constatat că partea sa proteică este o glicoproteină membranară a endoteliului vascular având greutate moleculară 57 kD şi o activitate cvasi - anticoagulantă (pe trei sferturi anticoagulantă). Într-adevăr, trombomodulina inhibă coagularea determinată de fibrinogen - sub inducerea trombinei. De fapt, ea promovează inactivarea trombinei de către antitrombină şi după fixare, activează forma zimogenică a proteinei C anticoagulante.

Din punct de vedere structural, la trombomodulină se disting mai multe domenii traversate de miezul proteic care are capătul N-terminal în extremitatea superioară iar capătul C-terminal în citosol (Fig. XIV 19). La nivelul miezului proteic se distinge o regiune cu 6 unităţi repetitive, urmată de o porţiune scurtă (cuprinzând multă serină/treonină) la care este ataşată componenta glicozaminoglicanică. În continuare, coborând spre capătul din citosol, se află o regiune transmembranară şi apoi "coada" cu C-terminal. După cum se remarcă în Fig. XIV. 19, trombomodulina conţine o singură catenă glicanică - formată din condroitin sulfat. Acesta este mult sulfatat iar catena sa se termină cu o trizaharidă sulfatată având secvenţa: Gal N Ac $(SO_4)_2$ - Glc A - Gal N Ac $(SO_4)_2$.

Activitatea anticoagulantă a trombomodulinei este atribuită - în cea mai mare măsură - componentei sale proteice şi pare că n-ar depinde de multiplele substituţii cu sulfat din condroitin sulfatul respectiv. Totuşi, s-a dovedit că forma de proteoglican a trombomodulinei are o capacitate mai mare de reglare a coagulării sângelui. Aceasta denotă că porţiunea glicozaminoglicanică potenţează activitatea ei anticoagulantă.

O remarcă de ordin general, desprinsă din cercetări recente referitoare la activitatea biologică a proteoglicanilor este aceea că ei - atât cei difuzaţi în matricea extracelulară cât şi cei de la suprafaţa celulelor - pot constitui adesea puncte sau regiuni de fixare tisulară a factorilor de creştere. Prin aceasta, mulţi proteoglicani devin capabili să moduleze şi activitatea factorilor de creştere.

Funcţiile biologice ale proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor

La descrierea proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor care intră în constituţia matricei extracelulare s-au menţionat şi funcţiile împlinite de fiecare în parte. Totuşi, pentru a se putea creia o vedere de ansamblu asupra acestor funcţii, ele sunt rezumate în tabelul XIV. 3.

Tabelul XIV. 3.

Principalele funcţii biologice ale proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor

- Sunt componente structurale în matricea extracelulară.
- Interacţionează specific cu colagenul, elastina, fibronectina, laminina şi alte proteine din matrice.
- Datorită compoziţiei lor polianionice leagă cationi.
- Contribue la turgescenţa caracteristică a unor ţesuturi.
- Joacă rol de "site" în matricea extracelulară.
- Înlesnesc migrarea celulară (în special, acidul hialuronic).
- Permit compresibilitatea cartilajelor (acidul hialuronic şi controitin sulfaţii).
- Asigură transparenţa corneală (keratan sulfatul I şi dermatan sulfatul).
- Joacă rolul de component structural în scleră (dermatan sulfatul).
- Anticoagulant (heparina).
- Sunt componente ale membranelor plasmatice, la nivelul cărora pot acţiona ca receptori şi participă la adeziunea celulară precum şi la interacţiile celulă - celulă (în special, heparan sulfatul).
- Determină schimburi selective la nivelul glomerulului renal (heparan sulfatul).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Asocieri între unele funcţii ale proteoglicanilor sau glicozaminoglicanilor constitutivi şi anumite boli

S-a menţionat anterior că acidul hialuronic înlesneşte migrarea celulară. Datorită acestei capacităţi, el poate permite şi migrarea celulelor tumorale prin matricea extracelulară. Însă, la rândul lor, celulele tumorale posedă capacitatea de a induce sinteza de către fibroblaşti a unor cantităţi sporite de acid hialuronic. Se înţelege deci că în acest fel este mult uşurată propria desvoltare a celulelor tumorale.

Aşa cum s-a specificat mai înainte, heparan sulfatul funcţionează ca receptor participând atât la adeziunea celulară cât şi la interacţiile celulă - celulă. Însă, celulele tumorale reţin la suprafaţa lor numai cantităţi foarte reduse de heparan sulfat. Acest fapt contribue - fără îndoială - la pierderea capacităţii lor de aderare.

Biosinteza şi degradarea proteoglicanilor

I) *Biosinteza proteoglicanilor.* Acest proces implică : (a)sinteza proteinei centrale (miezului proteic), (b) formarea trizaharidei de legătură şi ataşarea la miezul proteic, (c) sinteza şi lungirea catenelor oligozaharidice de glicozaminoglicani, (d) încheierea (terminarea) acestor catene.

a) Sinteza miezului proteic are loc în reticulul endoplasmatic din aminoacizi specifici. Este de remarcat faptul că în afară de aminoacizii participanţi la formarea miezului proteic, alţi aminoacizi suferă dezaminări şi astfel devin donatori de grupe $-NH_2$ necesare biosintezei de aminozaharuri participante la formarea glicozaminoglicanilor constitutivi. Cu alte cuvinte, aminoacizii servesc atât la biosinteza componentei proteice cât şi la biosinteza componentei glucidice a proteoglicanilor.

b) Formarea trizaharidei de legătură şi ataşarea la miezul proteic sunt procese care au loc tot în reticulul endoplasmatic şi decurg în ordinea următoare: Iniţial se stabileşte o legătură O-glicozidică între xiloză (Xy1) şi un rest de serină din lanţul polipeptidic al proteinei centrale. Procesul are loc în urma transferului xilozei din UDP-xiloză la serină. Ulterior, la restul de xiloză se ataşează un prim rest de galactoză (Gal) cu care se uneşte glicozidic şi apoi aceasta din urmă ataşează - tot prin legătură glicozidică - un al doilea rest de galactoză. Se constitue astfel trizaharida de legătură Xy1 - Gal - Gal.

În proteoglicanul cu keratan sulfat II legătura O-glicozidică se stabileşte între serină (sau treonină) din lanţul polipeptidic şi galactoza - N - acetilată, transferată de la UDP-Gal-NAc.

Ataşarea la miezul proteic se poate realiza şi prin stabilirea unei legături N-glicozaminice între N-acetilglucoză (din lanţul oligozaharidic) şi N-amidic al unui rest de asparagină din lanţul polipeptidic; ca în glicoproteinele cu N-legături.

c) Sinteza şi lungirea catenelor oligozaharidice sunt procese care se desfăşoară în aparatul Golgi. Resturile glucidice din aceste catene sunt procurate prin transfer din nucleotidele corespunzătoare (UDP-glucid), sub acţiunea glicozil transferazelor specifice fiecărui rest de glucid. Lungirea lanţului se face treptat începând de la restul de galactoză terminal al trizaharidei de legătură (Fig. XIV. 20).

Sistemele enzimatice implicate în lungirea catenei oligozaharidice sunt în măsură să reproducă fidel complexele glicozaminoglicanilor, acţionând totdeauna conform principiului "o enzimă, o legătură".

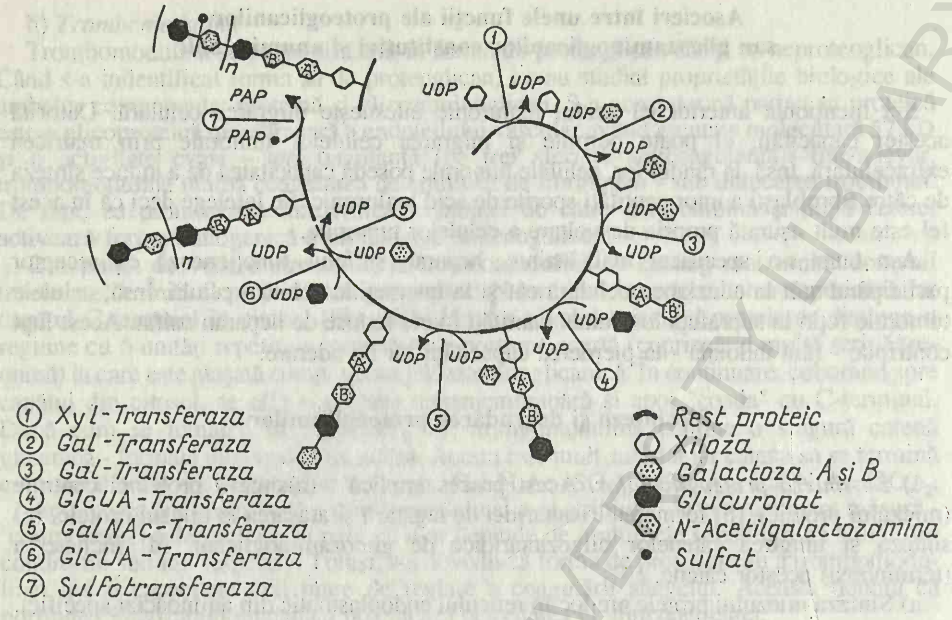


Fig. XIV. 20 - Biosinteza lanţului oligozaharidic al condroitin-4-sulfatului din proteoglicanul corespunzător

d) Terminarea catenelor oligozaharidice implică două procese: (1) progresarea creşterii catenei glicozaminoglicanilor în afara regiunii membranare şi (2) sulfatarea la anumite poziţii ale unora din resturile glucidice constituente. Enzimele care catalizează introducerea grupelor sulfat sunt diverse sulfotransferaze care folosesc, ca donor de aceste grupe, sulfatul activ de la 3 - fosfoadenozin-5-fosfosulfat (PAPS). Există sulfotransferaze specifice pentru fiecare din poziţiile C-2, 3, 4, 6 ale resturilor glucidice acceptoare.

După formarea catenei glicozaminoglicanilor, la unii din ei se fac modificări sterice sub acţiunea epimerazei care catalizează trecerea anumitor resturi de acid D-glucuronic (D-glucuronil) din catenă în resturi de acid L-iduronic (L-iduronil).

Biosinteza proteoglicanilor se află sub direct reglaj hormonal. În special, insulina şi glucocorticoizii intervin în biosinteza componentelor glucidice ale diverşilor proteoglicani. Astfel, insulina favorizează biosinteza acidului hialuronic şi a condroitin sulfaţilor. Acest fapt explică de ce la diabetici este mai mare pericolul infectării cu bacterii a ţesutului conjunctiv din tegumente sau din diverse alte organe. Cortizonul inhibă biosinteza glicozaminoglicanilor componenţi, ceea ce explică acţiunea defavorizantă a acestui hormon în procesul de vindecare a rănilor.

II) *Degradarea proteoglicanilor.* În majoritatea ţesuturilor s-a remarcat o degradare relativ rapidă a proteoglicanilor. Spre exemplu, în rinichi timpul de înjumătăţire al glicozaminoglicanilor componenţi este de 3-8 zile.

Degradarea proteoglicanilor începe sub acţiunea proteoglicanazei. Aceasta este o metaloenzimă, bine cunoscută, cu greutatea moleculară de cca 24,5 kD şi cu pH optim de activitate cuprins într-un domeniu mare (pH: 5-9). De asemeni, proteoglicanaza are şi o specificitate largă deoarece catalizează hidroliza legăturilor dintre condroitin sulfaţi şi proteinele centrale respective, în multe organe şi în numeroşi proteoglicani. Pe de altă parte, proteoglicanaza are şi capacitatea de a îndepărta peptidele de extensie din procolagen, precum şi de a degrada fibronectina.

După intervenţia preteoglicanazei, degradarea proteoglicanilor este continuată sub acţiunea unor hidrolaze lizozomale (exo şi endoglicozidaze) iar legăturile ester-sulfurice sunt hidrolizate de către sulfataze. Dintre glicozidaze, mai bine cunoscute - prin acţiunea şi specificitatea lor - sunt următoarele:

1) β - glucuronidaza care este o exoglicozidază şi hidrolizează legătura β - glicozidică a acidului glucuronic (sau iduronic) aflat la capetele nereducătoare ale lanţurilor polizaharidice. Substratele care cuprind aceşti acizi uronici şi asupra cărora acţionează β - glucuronidaza sunt: dermatan sulfatul, heparan sulfatul, condroitin sulfaţii şi acidul hialuronic;

2) α - L - iduronidaza este o exoglicozidază care îndepărtează hidrolitic resturi de acid iduronic ce se găsesc la capetele nereducătoare ale lanţurilor polizaharidice;

3) β - D - acetil - hexozaminidaza este o exoglicozidază care hidrolizează legăturile β - glicozidice ale N-acetilglucozei şi N-acetilgalactozei prezente la capetele nereducătoare ale glicozaminoglicanilor. Substratele utilizate sunt: condroitin sulfaţii, acidul hialuronic, dermatan sulfatul şi keratan sulfaţii (I şi II);

4) β - galactozidazele sunt exoglicozidaze şi există sub mai multe forme în ţesuturile animale. Ele au specificitate mare faţă de keratan sulfaţi deoarece aceştia cuprind multe legături β - galactozidice. Însă aceleaşi β - galactozidaze acide admit ca substrat şi condroitin sulfaţii;

5) aril-sulfatazele hidrolizează legăturile grupărilor sulfat din condroitin sulfaţi, keratan sulfat şi dermatan sulfat. Ele prezintă specificitate în raport cu locul ocupat de gruparea sulfat în N -acetilglucozamină sau în N-acetilgalactozamină;

6) iduronat sulfataza este o exoenzimă specifică ce clivează sulfatul de la C_2 dintr-un rest de acid iduronic aflat la capătul nereducător al heparinei, heparan sulfatului şi dermatan sulfatului.

În fig. XIV. 21 este prezentată schematic degradarea proteoglicanilor, fiind menţionate şi enzimele care hidrolizează trizaharidele de legătură dintre glicozaminglicani şi miezul proteic precum şi polipeptidazele care scindează lanţurile polipeptidice respective.

Este de remarcat că în cazul proteoglicanilor există un echilibru dinamic menţinut permanent între biosinteză şi degradare. Tulburarea echilibrului conduce la diverse stări patologice, prezentate mai departe (ultimul subcapitol).

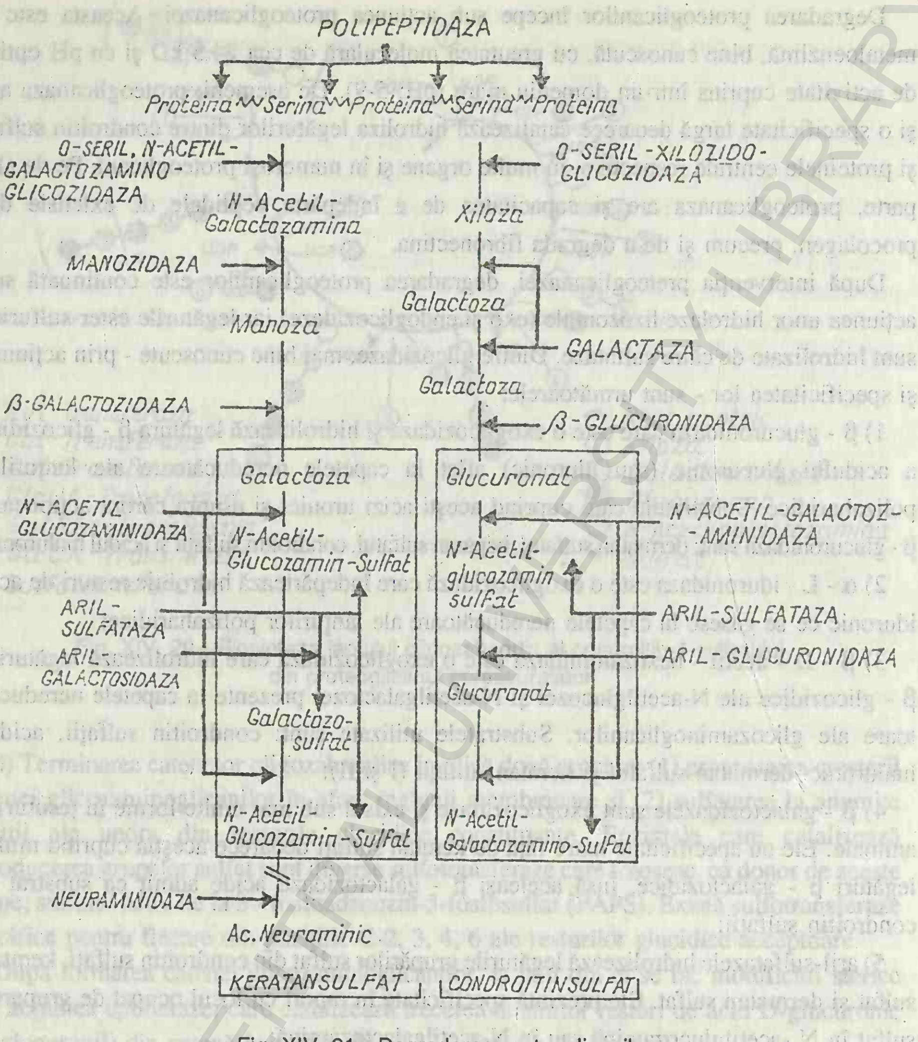


Fig. XIV. 21 - Degradarea proteoglicanilor

XIV. 2. ROLUL MATRICEI EXTRACELULARE ÎN CURSUL MORFOGENEZEI

Matricea extracelulară are un rol foarte important în cursul morfogenezei. Cercetările făcute în acest domeniu au arătat că mulţi constituenţi ai matricei extracelulare controlează fiecare etapă morfogenetică şi participă efectiv la desfăşurarea acestor etape. Actualmente se consideră chiar că unele modificări ce survin în sinteza şi localizarea diverşilor componenţi ai matricei extracelulare determină anumite anomalii morfofuncţionale.

De asemenea, s-a constatat că în cursul desfăşurării ontogenetice se schimbă şi proporţia sau natura constituenţilor matricei extracelulare, odată cu funcţiile pe care ea le capătă în scopul dirijării proceselor morfogenetice. Spre exemplu, în cursul morfogenezei corneii, pe măsură ce ţesutul pierde apă, în matricea extracelulară scade concentraţia acidului hialuronic şi creşte proporţia condroitin sulfaţilor. Ceva mai mult, în cursul dezvoltării ontogenetice se modifică şi tipul de colagen aflat în matricea extracelulară. Spre exemplu, celulele crestei neurale sintetizează iniţial colagen de tip I, integrat în structuri matriceale de tip fibrilar. Ulterior, în cursul dezvoltării, se sintetizează colagen de tip II. Însă acesta este specific pentru matricea extracelulară cartilaginoasă.

XIV. 3. MODIFICĂRILE CONSTITUENŢILOR MATRICEI EXTRACELULARE

Constituenţii matricei extracelulare pot suferi două genuri de modificări: fiziologice şi patologice.

Modificările fiziologice sunt asociate - în special - cu înaintarea în vârstă iar cele patologice se datoresc, adesea, funcţionării anormale a unor enzime care participă la anabolismul sau catabolismul constituenţilor respectivi.

În cele ce urmează sunt menţionate câteva modificări cantitative şi calitative ale unora din constituenţii matricei extracelulare.

XIV. 3.1. MODIFICĂRI ÎN FUNCŢIE DE VÂRSTĂ

Odată cu înaintarea în vârstă, la nivelul matricei extracelulare au loc modificări importante din punct de vedere cantitativ. Astfel, concentraţia colagenului creşte cu vârsta (în special, la nivelul pielei, aortei, diverselor catilaje), în timp ce scad concentraţiile glicozaminoglicanilor şi apei. Acest ultim fapt are ca rezultat schimbarea proprietăţilor fizice ale macromoleculelor matriceale; inclusiv ale colagenului care manifestă tendinţa de a cristaliza în interiorul fibrelor.

În ceea ce priveşte scăderea concentraţiei glicozaminoglicanilor, este de remarcat că ea se face preferenţial: numai pentru unii din ei şi numai în anumite organe. Spre exemplu, în cartilaje scade, în special, concentraţia condroitin-6-sulfatului, se reduce - în mai mică măsură - concentraţia condroitin-4-sulfatului iar concentraţia keratan sulfatului rămâne neschimbată sau adesea creşte. Deoarece lanţurile polizaharidice de controitin sulfaţi şi keratan sulfat sunt ataşate la aceeaşi catenă polipeptidică centrală, se consideră că odată cu înaintarea în vârstă au loc modificări ale biosintezei proteoglicanilor numai în unele regiuni dintr-un acelaşi complex funcţional. Asemenea modificări parţiale au consecinţe importante pentru gradul de hidratare al ţesutului respectiv (cartilajului) precum şi pentru posibilitatea eventualei sale calcifieri.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

XIV. 3.2. COLAGENOZELE

Colagenozele sunt boli în care au loc modificări calitative şi cantitative ale colagenului. În categoria acestor boli se încadrează artrita reumatismală, osteoartrita, lupusul eritematos precum şi unele boli ereditare. În cele ce urmează - aici, imediat - se specifică defectele metabolice dovedite în unele din aceste colagenoze.

În *artrita reumatismală* s-a constatat o activitate foarte crescută a enzimelor proteolitice lizozomale. Datorită acestui fapt, proteinele (în special colagenul) sunt degradate hidrolitic. Ca urmare, se reduce foarte mult numărul fibrelor de colagen din ţesutul corespunzător şi în locul lor apar infiltrate inflamatorii. Trebuie remarcat însă că în artrita reumatismală sunt degradate parţial şi macromoleculele de acid hialuronic din lichidul sinovial.

În *colagenozele ereditare* sunt implicate defecte enzimatice care conduc la fragilitatea şi hiperextensibilitatea unui număr mare de ţesuturi. Printre aceste defecte enzimatice mai frecvente sunt deficienţele de: lizin-hidroxilază, procolagen-N-peptidază şi procolagen-C-peptidază. Asemenea deficienţe enzimatice, asociate cu tulburări ale metabolismului cuprului, se întâlnesc în *sindromul Ehlers - Danlos* şi în *sindromul Menkes*. În principiu, lipsa oricărei enzime necesare sintezei de procolagen şi modificărilor care au loc după eliberarea lui din celulă reprezintă cauze potenţiale pentru declanşarea unei boli ereditare.

Colagenozele determinate genetic nu se datoresc totdeauna numai lipsei de enzime implicate în formarea colagenului. Astfel, în *sindromul Marfan* lanţurile α_2 sunt mai lungi şi nefuncţionale, ceea ce atrage stabilirea unor legături încrucişate anormale. Pe de altă parte, maladia numită *osteogenesis imperfecta* - care se caracterizează prin dezorganizarea totală a tendoanelor, ligamentelor, scheletului, sclerei - are drept cauză biosintetizarea de către fibroblaşti a unui colagen fetal (cuprinzând trei lanţuri polipeptidice identice de tip α_1) în locul colagenului normal (constituit dintr-un lanţ de tip α_2 şi două lanţuri de tip α_1). Această singură diferenţă structurală are multiple repercusiuni defavorabile manifestate la nivelul organelor menţionate: sclera este albastră, auzul este scăzut, oasele se deformează şi se fracturează uşor, etc.

XIV. 3.3. UNELE MODIFICĂRI CALITATIVE DOBÂNDITE

În avitaminoza C (*scorbut*) are loc o marcată deficienţă de prolil hidroxilază datorită lipsei de vitamină C care activează enzima. În consecinţă, nu se mai fac hidroxilările prolinei şi lizinei din constituţia colagenului şi astfel întreaga structură a acestuia este alterată.

În *diabet* se remarcă o îngroşare a pereţilor vaselor sangvine ale retinei. Aceste modificări pot conduce la scăderea vederii şi chiar la orbire.

În ceea ce priveşte repararea ţesuturilor după răniri (sau inflamaţii) s-a constatat că ea este întovărăşită adesea de proliferare fibroblastică şi cicatrizare. De fapt, formarea cicatricei presupune constituirea unor mănunchiuri (pachete) de fibrile de colagen. Trebuie remarcat însă că în cazul organelor parenchimale (spre exemplu, ficatul) cicatrizările repetate şi înlocuirea ţesutului normal cu colagen (ca în ciroză) pot conduce la deficienţe în funcţionarea organelor respective.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XIV. 3.4. MUCOPOLIZAHARIDOZELE

Mucopolizaharidozele sunt o categorie de boli genetice care se caracterizează prin depozitarea în ţesuturi şi excreţia urinară excesivă de glicozaminoglicani (mucopolizaharide, în denumirea mai veche). Aceste maladii se datoresc incapacităţii organismelor respective de a sintetiza unele enzime lizozomale implicate în degradarea glicozaminoglicanilor.

Referitor la deficienţele enzimatice caracteristice unor mucopolizaharidoze sunt de făcut următoarele remarci şi exemplificări utile:

- În deficienţa genetică de β - glucuronidază s-a constatat că se excretă prin urină dermatan sulfat, heparan sulfat, condroitin sulfat dar niciodată acid hialuronic. El este degradat iniţial de hialuronidază până la stadiul de tetrazaharid cu structura: (Glc UA - β 1,3 Glc NAc - β $1,4)_2$ iar apoi se perfectează - pe alte căi - şi degradarea tetrazaharidului.

- În deficienţa înăscută de β - D - acetilhexozaminidază trebuie precizat mai întâi faptul că s-au identificat două izoenzime (A şi B) ale acestei enzime. Izoenzima A este formată din două subunităţi diferite: α şi β, în timp ce izoenzima B conţine numai subunităţi β. În această situaţie, studiile au demonstrat că deficienţa genetică de β - D - acetilhexozaminidază se referă, de fapt, la lipsa uneia sau alteia din subunităţile izoenzimelor respective. Astfel, în *maladia Tay - Sachs* lipseşte subunitatea α şi deci izoenzima A este inactivă.

În *boala Sandhoff* lipseşte subunitatea β, ceea ce are ca rezultat atât deficienţa izoenzimei A cât şi a izoenzimei B. În ambele maladii au loc acumulări masive de gangliozide în creer, fapt care conduce la moarte prin infarct. Ţinând seama de aceste precizări, cele două maladii genetice (Tay - Sachs şi Sandhoff) atribuite deficienţei de β - D - acetilhexozaminidază, sunt - mai de grabă - sfingolipidoze decât mucopolizaharidoze şi de aceea ele nu sunt menţionate în Tabelul XIV. 4. Într-adevăr, în aceste cazuri biomolecula cea mai mult afectată de lipsa enzimei respective este o gangliozidă.

În deficienţa genetică de β - acid - galactozidază se constată acumulări tisulare atât de keratan sulfat cât şi fragmente de glicoproteine.

- Deficienţa înăscută de α - L - iduronidază este caracteristică *sindromului Hurler* iar lipsa genetică a iduronat sulfatazei este cauza *sindromului Hunter* (Tabelul XIV. 4.).

Faptul că în toate deficienţele genetice de enzime care degradează glicozaminoglicanii proteoglicanii corespunzători rămân ca atare, se creiază posibilitatea acumulării lor - în cantităţi anormal de mari - la nivelul diverselor ţesuturi. Această situaţie antrenează, la rândul ei, multiple şi variate modificări tisulare. Intr-adevăr, în mucopolizaharidozele cunoscute au loc frecvente schimbări în structura scheletului, dezvoltarea organelor este - în genere - întârziată, acuitatea auditivă se diminuiază sau chiar se pierde, se instalează o evidentă întârziere mentală, se produc tulburări cardio-pulmonare de diverse genuri şi intensităţi, se declanşează hepatosplenomegalie etc.

În Tabelul XIV. 4. sunt menţionate tipuri deosebite de mucopolizaharidoze, indicându-se pentru fiecare în parte glicozaminoglicanii eliminaţi predominant prin urină.

Tabelul XIV. 4.

Mucopolizaharidoze

Numele maladiei	*Denumirea prescurtată*	*Defectul enzimatic*	*Metaboliţii urinari*
Hurler, Scheie, Hurler/Scheie	MPS I	α - L iduronidaza	DS, HS
Hunter	MPS II	Iduronat sulfataza	DS, HS
Sanfilippo A	MPS III A	HSN - sulfataza (sulfamidaza)	HS(I)
Sanfilippo B	MPS III B	α-N-acetilglucozaminidaza	HS
Sanfilippo C	MPS III C	Acetiltransferaza	HS
Morquio	MPS IV	N-acetilgalactozamina-6-sulfat	KS
Asemănătoare cu Morquio	—	β -galactozidaza	KS
Maroteaux-Lamy	MPS VI	N-acetilgalactozamino-4-sulfataza	DS
Deficienţă de β - glucuronidază	MPS VII	β-glucuronidaza	DS,HS(I) CS
Modificare fără nume	MPS VIII	N-acetilglucozamino-6-sulfataza	HS, KS

MPS = mucopolizaharidoză; DS - dermatan sulfat ;
KS = keratan sulfat; HS - heparan sulfat.

În genere, pentru diagnosticarea mucopolizaharidozelor se cercetează activităţile enzimatice în fibroblaşti, leucocite, diverse ţesuturi, ser. Este însă de remarcat faptul că se poate stabili defectul enzimatic specific şi prin determinarea activităţii unor enzime în lichidul amniotic. Asemenea determinări prenatale sunt foarte importante pentru diagnosticarea mucopolizaharidozelor cu evoluţie letală.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. XV. NOŢIUNI DE NUTRIŢIE

XV. 1. INTRODUCERE

Nutriţia este o disciplină ştiinţifică, specială, care studiază bazele biochimice şi fiziologice ale alimentaţiei.

Viaţa oricărei fiinţe presupune o cheltuială continuă de energie şi, totodată, o permanentă degradare a constituenţilor organismului. Atât nevoile de energie cât şi cele corespunzătoare reînoirii constituenţilor tisulari sunt împlinite de alimentaţie. Însă, pentru ca să poată răspunde acestor nevoi, alimentele trebuie să aibă compoziţii chimice adecvate şi să fie consumate în cantităţi suficiente. În decursul timpului, nutriţia şi-a propus şi a reuşit să stabilească grupul complet de alimente necesare raţiei zilnice a omului. Mai mult chiar, la majoritatea alimentelor s-a putut fixa şi cantitatea optimă din fiecare precum şi asocierile lor cele mai potrivite pentru împlinirea nevoilor organismului. Pe de altă parte, s-a determinat modul în care variază necesarul alimentar al omului sănătos pe tot parcursul vieţii iar, în ultimul timp, nutriţioniştii au reuşit să înţeleagă în ce fel unii factori alimentari afectează şi sunt afectaţi de diverse boli sau tratamente medicale. Toate aceste obiective la care a ajuns să răspundă nutriţia sunt expuse - pe scurt - în cele ce urmează.

O primă problemă care va fi studiată în acest capitol este cea a necesarului nutritiv al omului, ţinând seama de cheltuielile energetice depuse în diverse condiţii fiziologice.

A doua problemă importantă - şi dezvoltată în capitolul de faţă - este cea a principiilor nutritive din constituţia hranei.

O a treia problemă - care va fi expusă în ultima parte a capitolului - priveşte datele referitoare la constituţia principalelor produse alimentare.

În încheierea acestui capitol se vor face unele consideraţii relative la modul în care se poate asigura sănătatea prin nutriţie corectă.

XV.2. NECESARUL NUTRITIV

Necesarul nutritiv al unui organism corespunde nevoilor lui energetice iar acestea sunt determinate de următorii factori: biosinteza constituenţilor specifici ai organismului, menţinerea temperaturii corpului şi efectuarea de travalii mecanice (activitatea musculară). Într-adevăr, organismul trebuie să dispună în permanenţă de energie pentru împlinirea cerinţelor anabolismului. Această necesitate este mai accentuată în perioada de creştere şi scade pe măsură ce organismul respectiv înaintează în vârstă (deoarece scade şi ritmul de sinteză a constituenţilor tisulari). Pe de altă parte, organismul consumă energie pentru ca să poată îndeplini o serie de activităţi fiziologice care au loc în cuprinsul său (respiraţie, circulaţie sanguină, menţinerea tonusului muscular, peristaltism intestinal) precum şi activităţile pe care le desfăşoară în mediul ambiant. În sfârşit, când temperatura mediului este scăzută, organismul trebuie să cheltuiască energie pentru a-şi menţine propria temperatură, producând căldura necesară acoperirii pierderilor termice.

XV. 2.1. CHELTUIALA DE ENERGIE

În principiu, necesarul energetic al unui organism aflat în stare de întreţinere este egal cu cheltuiala lui energetică. Se spune că un organism este în „stare de întreţinere" sau de „echilibru energetic" atunci când procesele anabolice sunt compensate perfect de cele catabolice, asa încât constituenţii organismului îşi menţin acelaş nivel. Datorită egalităţii dintre necesarul energetic şi cheltuiala de energie, stabilirea necesarului se reduce, într-o primă aproximaţie, la stabilirea cheltuielii.

Cheltuiala energetică variază mult în diverse condiţii. Ea poate fi determinată prin introducerea subiectului în interiorul unei camere izolate din punct de vedere termic şi prin măsurarea energiei eliberate. Aceasta este reprezentată de pierderea căldurii şi de produsele de excreţie. De regulă, este mult mai convenabil să se măsoare *consumul de oxigen* al subiectului deoarece, în majoritatea cazurilor, pentru 1 litru oxigen consumat se cheltuieşte o energie egală cu aproximativ 4,83 Kcal (20 kJ). Acest rezultat face posibilă calcularea indirectă a cheltuielii de energie prin măsurarea cantităţii de oxigen consumat în cazul desfăşurării diverselor tipuri de activităţi. Asemenea măsurători au demonstrat că pentru fiecare individ cheltuiala de energie depinde de trei factori: ritmul metabolsimului bazal, efectele termogenetice - specifice activităţii dinamice - şi nivelul activităţii fizice (musculare) depuse.

Metabolismul bazal

Determinările cheltuielii energetice (corespunzătoare necesarului energetic şi exprimate prin consum de oxigen) au arătat că - în stare de repaos şi echilibru termic - cheltuiala depinde de caracterele somatice ale omului. De fapt, în aceste condiţii, cheltuiala energetică - ireductibilă în condiţii fiziologice - este numită *metabolism bazal*. Metabolismul bazal a fost exprimat şi în funcţie de suprafaţa corporală. În acest caz, el corespunde unei cheltuieli energetice de 1000 kcal/24 ore/1 m^2 suprafaţă corporală.

Numele de „metabolism bazal" este justificat de faptul că este corespunzător cheltuielii energetice necesară menţinerii unor activităţi fiziologice *bazale*: respiraţie, ritm cardiac, funcţie renală, echilibru osmotic, activitate cerebrală, temperatura corpului. Este de precizat că determinările de metabolism bazal trebuie să se facă totdeauna în condiţii standard. Acestea presupun existenţa unui mediu cu temperatură caldă în care subiectul, aflat în stare de veghe, să stea în repaos complet iar măsurătorile respective să-i fie făcute după 12 ore de la ultima masă.

La persoanele de acelaşi sex şi aceeaşi vârstă, valorile metabolismului bazal sunt constante. Pentru indivizii de aceeaşi vârstă ele variază cu sexul, fiind totdeauna mai mari la bărbaţi iar pentru persoane de acelaş sex, valorile metabolismului bazal variază cu vârsta, fiind mai mari la tineri şi mai scăzute la bătrâni.

În afară de variaţiile în funcţie de vârstă şi sex, întâlnite în condiţii fiziologice, metabolismul bazal prezintă variaţii importante în unele afecţiuni; mai ales în cazuri de tulburări endocrine. Spre exemplu, în hipertiroidism el este mult crescut iar în hipotiroidism este redus. De asemenea, administrarea unor medicamente determină variaţii ale metabolismului bazal. Astfel, metabolismul bazal creşte sub influenţa medicamentelor stimulatoare ale sistemului nervos.

Efectele termogenetice

Metabolismul bazal nu reprezintă decât o parte din cheltuiala energetică a individului. Pentru cunoaşterea cheltuielii energetice totale trebuie ca la metabolismul bazal să se adauge cheltuiala energetică ce corespunde activităţii musculare iar, în unele condiţii de mediu, trebuie luată în considerare şi o cheltuială energetică fie de *termogeneză*, fie de *termoliză*. Prin cheltuială de termogeneză se înţelege cheltuiala de energie impusă organismului de necesitatea păstrării temperaturii proprii atunci când temperatura mediului este prea scăzută şi provoacă o pierdere termică excesivă. Într-adevăr, în această situaţie organismul trebuie să-şi intensifice metabolismul principiilor imediate astfel încât să compenseze pierderea termică excesivă. Pe de altă parte, organismul este pus uneori în situaţia să se opună unei creşteri a propriei lui temperaturi determinată de o temperatură prea ridicată a mediului. În asemenea cazuri, organismul respectiv transpiră astfel încât evaporarea transpiraţiei să determine scăderea temperaturii corpului (termoliza).

Cheltuiala energetică determinată de activitatea fizică depusă

Această cheltuială variază cu intensitatea activităţii depuse: cu cât efortul este mai mare, cu atât şi cheltuiala energetică este mai crescută peste cea corespunzătoare metabolismului bazal. În Tabelul XV.1. sunt prezentate cheltuielile energetice în funcţie de unele categorii de activităţi depuse.

Tabelul XV. 1.

Cheltuielile energetice corespunzătoare diverselor tipuri de activităţi fizice

Natura activităţii depuse	*Cheltuiala energetică (kcal/min.)*
Activitate sedentară (muncă intelectuală)	< 2,5
Activitate musculară uşoară (muncă de croitor, tipograf, bucătar)	2,5 - 4,3
Activitate musculară medie (muncă de grădinar, laborant)	5,0 - 7,4
Activitate musculară intensă (muncă de tâmplar, spărgător de lemne)	7,5 - 9,9
Activitate musculară foarte intensă (muncă de pietrar, încărcător cu lopata)	> 10
Înot lent	11,1
Înot rapid	14,2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În legătură cu energia cheltuită de organism în timpul efortului, trebuie precizat faptul că numai o parte din ea se transformă în lucru mecanic deoarece randamentul activităţii musculare este relativ redus (cca 30%).

Necesarul energetic

După cum s-a mai menţionat, la un organism sănătos aflat în stare de întreţinere, necesarul energetic procurat de hrană echilibrează perfect cheltuiala lui totală de energie. Ori de câte ori aportul depăşeşte cheltuiala, greutatea corpului creşte; organismul respectiv se îngraşă. Într-adevăr, calculele au dovedit că la un potenţial energetic de aproximativ 3500 kcal corespunde o cantitate de 0,45 kg grăsime corporală. Invers, când necesarul energetic este inferior cheltuielii depuse organismul slăbeşte. Situaţiile extreme în aceste două direcţii sunt: obezitatea şi respectiv, malnutriţia.

În Tabelul XV.2 sunt prezentate valorile medii (şi extreme) ale necesarului energetic pentru copii şi adulţi în cazul desfăşurării unor activităţi fizice uşoare.

Tabelul XV.2.

Necesarul energetic al copiilor şi adulţilor în funcţie de vârstă, greutate şi înălţime

Categoria	*Vârsta (ani)*	*Greutatea (kg)*	*Înălţimea (cm)*	*Necesarul energetic (kcal) Valori medii*	*limite*
Copii mici	0-0,5	6	60	kg x 115	95- 145
	0,5-1	9	71	kg x 105	80- 135
Copii	1- 3	13	90	1.300	900-1.800
	4- 6	20	112	1.700	1.300-2.300
	7-10	28	132	2.400	1.650-3.300
Bărbaţi	11-14	45	157	2.700	2.000-3.700
	15-18	66	176	2.800	2.100-3.900
	19-22	70	177	2.900	2.500-3.300
	23-50	70	178	2.700	2.300-3.100
	51-75	70	178	2.400	2.000-2.800
	76 +	70	178	2.050	1.650-2.450
Femei	11-14	46	157	2.200	1.500-3.000
	15-18	55	163	2.100	1.200-3.000
	19-22	55	163	2.100	1.700-2.500
	23-50	55	163	2.000	1.600-2.400
	51-75	55	163	1.800	1.400-2.200
	76 +	55	163	1.600	1.200-2.000

Necesarul energetic variază cu: caracterele somatice imediate (greutate, înălţime), vârsta, activitatea fizică desfăşurată, condiţiile de climă şi starea de sănătate. Într-adevăr, studiile efectuate pe pacienţi spitalizaţi au dovedit că stresul catabolic sever, caracteristic unor boli, determină creşterea cu mai mult de 100% a cheltuielii normale de energie. În asemenea cazuri se produce şi un dezechilibru azotat foarte marcat. Compensarea lor imediată se realizează prin mărirea substanţială a necesarului

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

energetic, adică prin suplimente de hrană adecvată. Situaţii similare de mărirea necesarului energetic prin suplimente de hrană se întâlnesc în condiţii de sarcină sau de alăptare, când nevoile sunt crescute cu 300-500 kcal/zi.

În cazul copiilor de diferite vârste (copii mici, aflaţi la pubertate, adolescenţi) nevoile energetice sunt determinate nu numai de compensarea metabolismului bazal şi a cheltuielilor prin efort fizic ci, într-o măsură considerabilă, şi de creştere (dezvoltare). Bineînţeles, şi în aceste condiţii creşterea nevoilor energetice se asigură prin suplimente alimentare corespunzătoare.

XV. 2.2. COMPOZIŢIA ŞI ENERGIA RAŢIEI ALIMENTARE

Din timpuri foarte vechi, experienţa umană a condus la stabilirea celei mai potrivite compoziţii a hranei pentru asigurarea completă a necesarului nutritiv. Se înţelege însă că această compoziţie optimă nu poate fi universală şi invariabilă în toate zonele geografice, ea depinzând de condiţiile climatice în care se dezvoltă şi trăieşte omul; este în raport cu conţinutul în substanţe nutritive ale solului pe care cresc vegetalele utilizate ca surse alimentare; este în funcţie de posibilităţile de păstrare şi depozitare a alimentelor precum şi de obiceiurile tradiţionale de prelucrare culinară. Aceşti ultimi doi factori contribuie, de multe ori, la scăderea valorii nutritive a hranei. Totuşi, indiferent de natura şi acţiunea factorilor de variabilitate, experienţa a dovedit că o compoziţie optimă de hrană se asigură numai prin includerea, în proporţii bine echilibrate, a tuturor principiilor nutritive. Din punct de vedere calitativ, necesarul esenţial pentru nutriţia omului sănătos este prezentat în Tabelul XV.3.

Tabelul XV.3.

Principiile esenţiale de nutriţie ale omului

Categoria	*Speciile corespunzătoare*
Aminoacizi	Histidina[1)], izoleucina, leucina, lizina, metionina (cisteina[2)]), fenilalanina (tirozina [2)]), treonina, triptofanul, valina
Acizi graşi	Acid linoleic (acid arahidonic [2)]), acid α - linolenic [3)]
Vitamine hidrosolubile	Acid ascorbic, biotina[4)], cobalamina, acid folic, niacina, acid pantotenic, piridoxina, riboflavina, tiamina
Vitamine liposolubile	A,D[5)], E, K[4)]
Elemente minerale	Calciu, clor, magneziu, fosfor, potasiu, sodiu
Oligoelemente	Crom, cupru, iod, fer, mangan, molibden, seleniu, zinc.
Fibre	Necesare pentru peristaltismul intestinal
Apă	Componentul cel mai „critic" al raţiei
Energie	Utilizarea glucidelor, lipidelor şi proteinelor în proporţii variate

1) Necesar pentru copii foarte mici şi probabil necesar pentru copii mai mari sau pentru adulţi.
2) Cisteina, tirozina şi acidul arahidonic economisesc - respectiv - necesarul de metionină, fenilalanină şi acid linoleic.
3) Unii autori consideră că acidul linolenic nu ar fi esenţial pentru om
4) Biotina şi vitamina K sunt sintetizate şi de către flora bacteriană din intestin.
5) Prin expunerea pielei la razele solare se reduce necesarul dietar de vitamină D.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În categoria principiilor nutritive, constituente permanente ale hranei, un loc central îl ocupă grupul glucidelor, lipidelor şi proteinelor deoarece prezenţa acestora este absolut obligatorie în orice raţie alimentară completă. De aceea, ele sunt numite şi „principii imediate", fiind utilizate de organism în primul rând. Dintre ele, glucidele şi lipidele participă, în special, la procurarea de energie iar proteinele sunt folosite pentru refacerea tisulară. Cu toate acestea, aşa cum au dovedit determinările respective, proteinele au şi ele o valoare energetică, proprie, de care se ţine seamă la calcularea cantităţii totale de energie a raţiei.

Pentru determinarea energiei totale disponibile în hrană se ia în considerare totdeauna energia eliberată prin oxidarea celor trei tipuri de principii nutritive imediate (glucide, lipide, proteine) aflate în raţia alimentară. Această energie se măsoară prin metode calorimetrice.

Determinările făcute prin arderea fiecărui fel de principiu imediat (în bomba calorimetrică) au dus la concluzia că arderea unui gram de glucide liberează 4,1 kcal, a unui gram de lipide 9,3 kcal şi a unui gram de proteine 5,4 kcal. Aceste valori reprezintă *căldurile de combustie* ale fiecărui tip de principiu nutritiv imediat.

Ţinând seama de faptul că în organism glucidele şi lipidele sunt oxidate complet (până la dioxid de carbon şi apă), ca şi în bomba calorimetrică, se poate conchide că pentru aceste categorii de principii imediate valorile căldurilor de combustie sunt identice cu valorile energetice efective ale substanţelor în organism. Proteinele însă nu sunt oxidate complet în organism - până la dioxid de carbon, apă şi azot - ca în bomba calorimetrică. Cea mai mare parte din carbonul şi hidrogenul pe care-l cuprind se transformă, prin oxidare, în dioxid de carbon şi apă iar azotul lor, precum şi câte o parte din carbon şi hidrogen, se elimină sub formă de produşi azotaţi prin urină; în special, sub formă de uree. În aceste condiţii, valoarea energetică efectivă a proteinelor în organism nu este egală cu căldura lor de combustie în bomba calorimetrică ci este mai mică. Scăzând însă din căldura de combustie a proteinelor, în bombă, aceea a ureii şi a celorlalţi compuşi azotaţi - eliminaţi prin urină - se obţine valoarea energetică efectivă a proteinelor în organism. Această valoare este de 4,1 kcal pentru 1 g proteine (în loc de 5,4 kcal/g, valoarea calorifică sau căldura de combustie a proteinelor în bomba calorimetrică).

Căldurile de combustie şi energiile disponibile corespunzătoare pentru cele trei categorii de principii imediate sunt prezentate în Tabelul XV.4.

Tabelul XV.4.

Căldurile de combustie şi energiile disponibile în organism pentru cele trei categorii de principii nutritive imediate

Principiul nutritiv imediat	*Căldura de combustie kcal/g*	*Energia disponibilă în organism, kcal/g*
Glucide	4,1	4,1
Lipide	9,3	9,3
Proteine	5,4	4,1

După cum se observă, cifrele consemnate în Tabelul XV. 4 arată că energia disponibilă, conţinută în unitatea de masă, pentru lipide este mai mult decât dublă faţă de cea corespunzătoare glucidelor sau proteinelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XV.3. PRINCIPIILE NUTRITIVE

Aşa cum s-a mai menţionat, fiecare categorie de principii nutritive - prezentate în tabelul XV.3 - îşi are funcţiile sale specifice şi relaţii bine determinate cu organismul. Cu toate acestea nici una din categoriile de principii nutritive nu funcţionează sau nu acţionează independent. Asemenea inter-relaţii vor fi ilustrate în cele ce urmează; însă, pentru raţiuni de ordin didactic, fiecare categorie este prezentată separat, subliniindu-se caracterele sale specifice.

XV.3.1. GLUCIDELE

Cea mai mare parte din hrana obişnuită a omului este constituită din glucide sau zaharuri. Prezenţa obligatorie a glucidelor în raţia alimentară este justificată de faptul că ele sunt principii nutritive energizante prin excelenţă. Într-adevăr, aşa cum se ştie din studiul metabolismului glucidelor, degradarea lor în organism furnizează energie pentru toate funcţiile acestuia şi, în mod special, pentru activitatea musculară.

Glucidele prezintă avantajul că pot fi uşor digerate şi absorbite; de asemenea, ele ajută la metabolizarea altor categorii de principii nutritive; în special, a lipidelor. Deoarece în organism porţiunea glicerolică a unor categorii de lipide (trigliceride) şi catenele hidrocarbonate ale unor aminoacizi (glucoformatori) se pot transforma în glucoză, glucidele s-ar părea că nu sunt absolut esenţiale în raţia alimentară. Totuşi, în absenţa lor se instalează starea de „cetoză" (vezi metabolismul glucidelor şi metabolismul lipidelor) şi, ca urmare, apar alte turburări metabolice grave: pierderi semnificative de apă şi de anumiţi electroliţi, degradări excesive de proteine musculare, etc. Pentru prevenirea acestor efecte defavorabile se recomandă ca raţia zilnică să includă un aport de 50-100 g glucide.

Din punct de vedere calitativ pot fi utilizate pentru hrană oricare din glucidele ce eliberează, în urma digestiei, monozaharidele: glucoză, galactoză, fructoză, manoză. De fapt, în raţia obişnuită a omului intră următoarele glucide: amidonul (polizaharid din vegetale), zaharoza (dizaharid din sfecla de zahăr sau trestia de zahăr) lactoza (dizaharid din lapte), glucoza şi fructoza (monozaharide din fructe). În organism, după cum se ştie, toate aceste glucide ajung să se transforme în glucoză.

În genere, este preferabil ca glucidele să fie consumate „în forme naturale" datorită faptului că sursele naturale cuprind şi alte substanţe necesare organismului (vitaminele B, E şi substanţe minerale în cereale; vitaminele B, C şi substanţe minerale în cartofi; vitamina C şi substanţe minerale în fructe). Însă, în această privinţă, un neajuns îl constituie faptul că multe principii nutritive din alimentele care conţin şi glucide se îndepărtează sau sunt distruse în timpul prelucrării surselor naturale. Spre exemplu, când bobul de grâu este transformat în făină albă, se îndepărtează stratul de la suprafaţa externă a bobului (cortexul) şi a germenului de grâu.

Sursele vegetale care procură glucidele hranei obişnuite a omului cuprind însă şi celuloză. Aceasta, deşi face parte din categoria glucidelor, nu este digerată în tractul digestiv uman. Ea este totuşi valoroasă din punct de vedere dietetic deoarece stimulează peristaltismul intestinal şi ajută la formarea şi eliminarea fecalelor. (A se vedea mai departe „fibrele alimentare".)

Alte glucide care intră în constituţia hranei obişnuite a omului sunt pentozele (monazaharide) şi polizaharidele formate din pentoze. Acestea din urmă nu au valoare nutritivă, fiind absorbite şi excretate, ca atare. Însă, unele pentoze sunt transformate în organism - după cum s-a arătat la metabolismul glucidelor - în glucoză, participând astfel în mod indirect la împlinirea rolurilor acesteia.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XV.3.2. LIPIDELE

Lipidele sau grăsimile reprezintă categoria de principii nutritive care constituie o componentă importantă a raţiei alimentare. Necesitatea prezenţei lipidelor în raţie rezultă din următoarele însuşiri specifice pe care acestea le prezintă:

(1) - au cea mai „concentrată" valoarea energetică din raţie. Într-adevăr, aşa cum s-a arătat în subcapitolul precedent, lipidele eliberează în organism 9,3 kcal/g, mai mult decât dublul energiei eliberate de glucide sau proteine (câte 4,1 kcal/g);

(2) - se pot consuma în stare uscată (ca atare) spre deosebire de proteine şi polizaharide care nu au gust în stare uscată şi nu pot fi consumate decât după o prealabilă preparare (de obicei, cu apă).

(3) - sunt solvenţi pentru vitaminele liposolubile (A,D,E,K) şi pentru caroteni (provitamine A), substanţe aflate şi ele în raţia alimentară;

(4) - înlesnesc absorbţia vitaminei D şi, prin aceasta, a calciului, ajutând astfel - în mod indirect - la utilizarea calciului de către organism (în special, la fixarea lui în oase şi dinţi);

(5) - contribue, după metabolizare în organism, la formarea „lipidelor de depozit" care ajută la protejarea organelor interne (rinichi, inimă, ficat) şi la păstrarea temperaturii constante a corpului;

(6) - ajută la prelungirea procesului de digestie, încetinind secreţiile stomacale ce conţin acid clorhidric. Datorită acestui fapt, apare senzaţia de saţietate şi de îngreunare după o masă bogată în grăsimi.

În ceea ce priveşte însuşirea lipidelor de a furniza energie organismului, se remarcă diferenţe între cele de origină animală şi cele de origină vegetală. În general, lipidele animale au o valoare biologică superioară celor de origină vegetală deoarece ele conţin mai multe vitamine liposolubile; în special, vitaminele A şi D. Lipidele de origină animală conţin o proporţie semnificativ mai mare de acizi saturaţi iar colesterolul se află numai în această categorie de lipide. Diferenţele de compoziţie dintre lipidele animale şi vegetale pot avea implicaţii importante în starea de sănătate. Într-adevăr, la populaţiile care consumă multe grăsimi animale incidenţa obezităţii, cancerului de colon şi bolilor de inimă (coronariene) este foarte mare. De altfel se ştie că împreună cu fumatul şi hipertensiunea, nivelul crescut al colesterolului seric, ca urmare a hrănirii cu raţii bogate în colesterol (grăsimi animale), reprezintă un factor de risc important în instalarea şi progresarea procesului aterosclerotic.

Deşi capacitatea de dizolvare a vitaminelor liposolubile de către lipidele de origină vegetală este mai redusă, ele au o valoare biologică apreciabilă datorită faptului că pot cuprinde acizi graşi esenţiali. După cum s-a mai menţionat, principalii acizi graşi esenţiali sunt: acidul linoleic, acidul linolenic şi acidul arahidonic. Ei intră, în proporţii diferite şi utile, în constituţia tuturor uleiurilor comestibile; extrase din seminţele anumitor specii vegetale. Până în prezent, nu există recomandări speciale cu privire la necesarul de acizi graşi esenţiali. S-a constatat însă că într-o raţie alimentară care procură 2000-3000 kcal/zi, 5 g acid linoleic, ajung să împlinească nevoile organismului. De altfel, această cantitate este mult inferioară celei de 23 g/zi, apreciată ca disponibilă în hrana obişnuită. Datorită acestei disponibilităţi se explică faptul că nu se întâlneşte deficienţă de acizi graşi esenţiali. Acidul linolenic şi alţi omologi ai lui (cu trei duble legături), precum şi acidul arahidonic (cu patru duble legături) sunt indirect sau direct precursori ai leucotrienelor, prostaglandinelor şi tromboxanilor care funcţionează ca „hormoni locali". Aşa cum se ştie, printre alte însuşiri, prostaglandinele au şi rolul de a

rolul de a împiedica agregarea plachetară. Relativ recent s-a emis părerea că incidenţa redusă a bolilor de inimă coronariene la eschimoşii din Groenlanda trebuie atribuită prezenţii acizilor graşi esenţiali, cu trei duble legături, care intră în constituţia grăimilor somonilor şi scrumbiilor, hrana de bază a acestei populaţii. De altfel, în ultimii ani s-a stabilit că aportul dietar în care acizii graşi esenţiali reprezintă 1-2% din valoarea sa energetică asigură totdeauna prevenirea deficienţii clinice.

Lipidele sunt consumate în cantitate mai mare în regiunile puţin luminate de soare. Populaţiile care trăiesc în climă temperată nu pot consuma cantităţi excesive de lipide fără consecinţe dăunătoare pentru organism. Într-adevăr, când consumul de lipide este foarte mare se diminuează, în mod apreciabil, cel de glucide. Acest fapt atrage, după cum s-a mai spus, instalarea stării de *cetoză*. Este totuşi de remarcat că predispoziţia la cetoză pare a fi, în mare măsură, o problemă de adaptare. Astfel, s-a constatat că eschimoşii, trăind într-o regiune în care nu se produc alimente cu conţinut glucidic, au câştigat toleranţă mare pentru lipide. Şi obezii au o toleranţă mare pentru lipide. Pe de altă parte, există unele populaţii care - datorită resurselor locale insuficiente - s-au obişnuit să consume în raţie cantităţi foarte mici de grăsimi. Deşi în asemenea împrejurări efectele dăunătoare nu sunt imediat vizibile, cu timpul se manifestă şi deficienţa de vitamine liposolubile, ca urmare a deficienţii de lipide din raţie. În aceste cazuri apar diverse modificări cutanate, eczeme iar în stări de deficienţă extremă se poate ajunge chiar la întârzieri de creştere şi dezvoltare.

XV.3.3. PROTEINELE

Proteinele sunt principii nutritive cu rol plastic, în sensul că sunt necesare pentru creşterea organismului tânăr şi menţinerea (întreţinerea) celui adult. În mod normal, în organism are loc o reînoire proteică, zilnică, în proporţie de 1-2% din totalul proteinelor corpului.

Importanţa şi necesitatea prezenţei proteinelor în raţii, pentru menţinerea bunei funcţionări a celulelor din organism şi pentru asigurarea refacerii ţesuturilor uzate (piele, păr, unghii), rezultă din faptul că organismul adult elimină zilnic produse azotate prin urină, salivă, fecale; chiar atunci, când el se află în stare de inaniţie. Deoarece în inaniţie produsele azotate eliminate provin din degradarea proteinelor tisulare proprii organismului, se înţelege că este neapărat nevoie ca acesta să primească, odată cu raţia, proteine care să le înlocuiască pe cele pierdute. Numai astfel organismul se poate menţine în stare de „echilibru azotat". Se spune că un organism se află în echilibru azotat când cheltuiala de substanţe azotate, în special de proteine, este acoperită de un aport corespunzător de proteine în raţia alimentară. Pe de altă parte, necesitatea proteinelor în raţie pentru asigurarea sintezei de proteine noi în ţesuturi este deosebit de evidentă în unele stări fiziologice speciale; spre exemplu, în gestaţie şi lactaţie. Într-adevăr, femeile gravide au nevoie de o alimentaţie mai bogată în proteine pentru construirea substanţelor proteice noi, necesare dezvoltării uterului şi fătului. De asemeni, femeile care alăptează au şi ele nevoie de un regim mai bogat în proteine pentru ca acestea să servească în organism la formarea proteinelor laptelui.

După cum s-a menţionat în capitolul privind proteinele, pentru formarea de proteine proprii organismul are nevoie de 20-22 aminoacizi. Cu excepţia a 8 dintre ei, numiţi aminoacizi esenţiali, toţi ceilalţi aminoacizi pot fi sintetizaţi şi în organismul omului. Cei 8 aminoacizi esenţiali figurează şi în Tabelul XV.5, în care sunt menţionate cantităţile apreciate ca necesare copiilor şi adulţilor.

Aşa cum s-a specificat în Tabelul XV.3, histidina s-a dovedit că este un aminoacid esenţial pentru copii mici (cu necesar zilnic de 28 mg/kg corp) dar nu s-a stabilit necesarul ei pentru copii mai mari. De asemenea, până de curând, arginina a fost şi ea considerată aminoacid esenţial necesar dezvoltării normale a copilului.

Tabelul XV.5

Necesarul zilnic* de aminoacizi esenţiali în funcţie de vârstă

Aminoacidul	Copil mic (4-6 luni)	Copil (10-12 ani)	Adult	Conţinutul în aminoacizi esenţiali ai proteinelor de calitate superioară (mg/g proteină)
Izoleucină	70	28	10	42
Leucină	161	42	14	70
Lizină	103	44	12	51
Metionină (+cisteină)	58	22	13	26
Fenilalanină (+tirozină)	125	22	14	73
Treonină	87	28	7	35
Triptofan	17	3,3	3,5	11
Valină	93	25	10	48

*) În mg/kg greutate corp.

Majoritatea proteinelor care intră în constituţia hranei cuprind toţi aminoacizii esenţiali în proporţii diferite. Cu privire la aceste proporţii sunt necesare următoarele precizări : (1) cantităţile de aminoacizi esenţiali din raţie şi proporţiile dintre ei trebuie să fie foarte apropiate de necesarul organismului în aceşti aminoacizi; (2) dacă un aminoacid esenţial se află într-o cantitate foarte mică, sau lipseşte in raţia proteică, biosinteza proteinelor în organism scade până la un nivel foarte redus sau chiar încetează; (3) în anumite alimente unul sau mai mulţi aminoacizi esenţiali se pot găsi în cantităţi foarte mici în raport cu alţii. Acest fapt modifică mult proporţia de aminoacizi esenţiali necesari organismului; (4) aminoacidul esenţial din raţie care se află în cantitate foarte mică, sau este absent, se numeşte aminoacid limitant. În organism, după asimilarea proteinei respective, el se află în cea mai redusă cantitate din necesarul zilnic de aminoacizi; (5) aminoacidul esenţial limitant este factorul determinant pentru stabilirea cantităţii şi calităţii proteinei utilizată de organism.

Ţinând seama de precizările menţionate, se înţelege că nu toate proteinele din raţie sunt în măsură să procure toţi aminoacizii esenţiali şi să acopere nevoile azotate ale organismului, adică să se transforme în proteine proprii lui. Această însuşire se numeşte valoare *biologică* sau *metabolică* a proteinelor.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteinele complexe (cu număr mare şi variat de aminoacizi, inclusiv aminoacizi esenţiali) au valori biologice mari şi se numesc *proteine complete*. Cele care cuprind un număr limitat de aminoacizi esenţiali şi neesenţiali nu sunt în măsură să procure organismului material necesar pentru refacerea ţesuturilor proprii; ele au valori biologice mici şi se numesc proteine incomplete. În general, proteinele de origină animală (din carne, lapte şi produse lactate) sunt proteine complete, în timp ce proteinele de origină vegetală (din legume şi fructe) sunt *proteine incomplete*. Acest fapt relevă superioritatea proteinelor de origină animală faţă de cele de origină vegetală. De aceea, în alcătuirea unei raţii alimentare adecvate trebuie să se asocieze cu grijă alimentele ce conţin proteine sărace în aminoacizi cu cele care cuprind aminoacizii respectivi în cantităţi suficiente. În cazuri contrare, prin administrarea mai îndelungată de raţii neadecvate, din acest punct de vedere, apar deficienţe proteice cu manifestări multiple, variate şi grave. Printre ele se observă frecvent scăderea rezistenţei la infecţii, întârzieri în vindecarea rănilor şi chiar instalarea depresiunii nervoase (sub diferite aspecte).

Pe lângă prezenţa anumitor aminoacizi (în special, cei esenţiali) în constituţia proteinelor din raţie, un alt factor care afectează utilizarea lor este raportul dintre potenţialul energetic al raţiei şi proteinele pe care ea le conţine. Într-adevăr, echilibrul azotat necesită atât un aport adecvat de proteine, cât şi unul de componente energetice. Deficienţa oricăreia din aceste două categorii de componente are ca rezultat un echilibru azotat negativ, caracterizat prin excreţii azotate mai mari decât reţinerile. În schimb, când aportul energetic al raţiei este mare şi suficient pentru acoperirea nevoilor organismului, echilibrul azotat este atins uşor cu un aport proteic relativ redus (deoarece catenele hidrocarbonate ale aminoacizilor respectivi nu sunt solicitate şi ele pentru degradări cu producere de energie). Cercetările au demonstrat că pentru menţinerea echilibrului azotat, aportul energetic al raţiei trebuie să fie egal cu 1,5 x cheltuiala de energie corespunzătoare metabolismului bazal. În aceste condiţii, raţia cea mai potrivită (pentru menţinerea echilibrului azotat) este aceea care procură proteine în proporţie de 12-15% din aportul energetic. Într-adevăr, raţiile prea bogate în proteine nu conferă avantaje speciale ci, mai degrabă, produc neajunsuri. Astfel, la copii prematuri administrarea raţiilor cu conţinut proteic prea mare poate determina efecte toxice. Pe de altă parte, raţiile foarte bogate în proteine ale adulţilor produc tulburări ale funcţiilor renale.

Activitatea fizică desfăşurată joacă şi ea un rol important în stabilirea nivelului proteic dietar. S-a constatat că, în genere, activitatea fizică determină creşterea retenţiei azotate din proteinele raţiei.

Aportul insuficient al hranei (deci cantităţi insuficiente de proteine şi de alimente energetice) determină *malnutriţia proteino-energetică*. Ea este combătută prin creşterea cantitativă şi calitativă atât a componentelor proteice cât şi a celor energetice din raţie. Malnutriţia proteino-energetică se poate declanşa şi în caz de malabsorbţie, intervenţii chirurgicale pe tractul digestiv sau în diverse boli grave. În asemenea situaţii recuperările necesită administrarea de suplemente nutriţionale (proteice şi energetice) sub control riguros şi supraveghere medicală.

XV.3.4. VITAMINELE

După cum s-a menţionat în capitolul consacrat studiului vitaminelor şi coenzimelor (Cap. III), în funcţie de solubilitatea în apă sau grăsimi, există două categorii de vitamine: hidrosolubile şi liposolubile. Indiferent de categoria căreia îi aparţine, fiecare vitamină se află în cantităţi variate în diverse alimente (Tabelul XV.19).

Digestia vitaminelor comportă unele particularităţi. Astfel, după ingerarea şi trecerea în tractul gastro-intenstinal a alimentelor care conţin vitamine hidrosolubile, acestea din urmă sunt absorbite în vena portă iar surplusul lor este excretat prin urină. Datorită acestor procese, vitaminele hidrosolubile se depozitează numai în foarte mică măsură în organism şi, de aceea, este necesar ca ele să fie procurate în mod continuu de către raţia alimentară. Totuşi, în ficat se depozitează constant mici cantităţi de acid folic. Tot în ficat se mai depozitează foarte puţin acid ascorbic şi mai multă vitamină B_{12}.

În ceea ce priveşte vitaminele liposolubile - care se găsesc atât în lipidele vegetale cât şi în cele animale din hrană - ele sunt digerate odată cu grăsimile respective. Prin urmare, după absorbţia la nivel intestinal ele sunt incorporate în chilomicroni şi transportate la ficat. Acesta este organul principal de depozit al vitaminelor A, D şi K iar ţesutul adipos reprezintă cel mai important loc de depozit pentru vitamina E. Vitaminele liposolubile nu se excretă prin urină.

Deşi vitaminele nu reprezintă materiale structurale şi nu au valoare energetică sunt importante pentru organism datorită rolurilor funcţionale pe care le împlinesc. Intr-adevăr, aşa cum s-a arătat în Cap. III, majoritatea lor sunt constituenţi enzimatici (coenzime). În această calitate vitaminele participă aproape la toate reacţiile metabolice; atât la degradări cât şi la constituire de structuri tisulare.

După cum s-a mai precizat, pentru împlinirea funcţiilor biologice organismul omului are nevoie zilnic de cantităţi foarte mici de vitamine (câteva mg sau chiar micrograme) iar raţia alimentară trebuie să le procure regulat şi în măsură necesară. Acest necesar de vitamine variază cu vârsta, sexul, starea fiziologică, clima şi natura activităţii depuse. Cu toate cauzele multiple de variaţie a necesarului vitaminic, se indică totuşi unele niveluri absolut indispensabile bunei funcţionări a organismului. Aceste niveluri, menţionate în Tabelul XV.6, sunt raportate la persoane sănătoase care depun o muncă uşoară şi în climat temperat.

Este de remarcat că acest necesar vitaminic, adus de raţia alimentară zilnică, trebuie să fie riguros respectat; în caz contrar, atât depăşirile cât şi reducerile aportului vitaminic atrag tulburări metabolice şi dezechilibre periculoase pentru starea de sănătate a organismului. Excesul vitaminic se acumulează în corp provocând stări grave de toxicitate. Asemenea situaţii au fost puse în evidenţă în cazul supradozelor de vitamină A, vitamină D şi vitamină E. În cazul vitaminei liposolubile K se pot produce stări de toxicitate când se folosesc tratamente îndelungate cu cantităţi mari de medicamente ce conţin vitamina K (dispersată în apă). În schimb, ingerarea unor cantităţi excesive de vitamine hidrosolubile este uşor tolerată de organism, cu excepţia situaţiei întâlnite la administrarea în cantitate mare de niacină sub formă de acid nicotinic când se constată efecte secundare nocive. Şi excesele de vitamină C sau de vitamină B_6 sunt mai greu suportate. În general, cu excepţia unor indicaţii terapeutice exprese, administrarea supradozelor de vitamine este periculoasă şi trebuie evitată. Pe de altă parte, deficienţa sistematică şi prelungită de vitamine în raţia alimentară declanşează anumite maladii. Exemple de asemenea situaţii sunt prezentate în Tabelul XV.7.

Tabelul XV. 6.

Necesarul zilnic de vitamine al omului

Categoria	Vârsta (ani)	Greutatea (kg)	Înălţimea (cm)	Vitaminele liposolubile				Vitamine hidrosolubile							
				A (μgRE)[1]	D (μg)[2]	E (mgα-TE)[3]	K (μg)	Vit. C (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	PP (mg NE)[4]	Vit. B_6 (mg)	Folat (μg)	Vit. B_{12} (μg)	Biotina (μg)
Copii mici	0,0-0,5	6	60	375	7,5	3	5	30	0,3	0,4	5	0,3	25	0,3	10
	0,6-1	9	71	375	10	4	10	35	0,4	0,5	6	0,6	35	0,5	15
Copii	1-3	13	90	400	10	6	15	40	0,7	0,8	9	1,0	50	0,7	20
	4-6	20	112	500	10	7	20	45	0,9	1,1	12	1,1	75	1	25
	7-10	28	132	700	10	7	30	45	1,0	1,2	13	1,4	100	1,4	30
Bărbaţi	11-14	45	157	1000	10	10	45	50	1,3	1,5	17	1,7	150	2,0	
	15-18	66	176	1000	10	10	65	60	1,5	1,8	20	2,0	200	2,0	
	19-24	72	177	1000	10	10	70	60	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0	30-
	25-50	79	176	1000	5	10	80	60	1,5	1,7	19	2,0	200	2,0	100
	51 +	77	173	1000	5	10	80	60	1,2	1,4	15	2,0	200	2,0	
Femei	11-14	46	157	800	10	8	45	50	1,1	1,3	15	1,4	150	2,0	
	15-18	55	163	800	10	8	55	60	1,1	1,3	15	1,5	180	2,0	
	19-24	58	164	800	10	8	60	60	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0	30-
	15-50	63	163	800	5	8	65	60	1,1	1,3	15	1,6	180	2,0	100
	51 +	65	160	800	5	8	65	60	1,0	1,2	13	1,6	180	2,0	
Femei gravide				800	10	10	65	70	1,5	1,6	17	2,2	400	2,2	
Femei care alăptează				1300	10	12	65	95	1,6	1,8	20	2,1	280	2,6	

1) Echivalenţi de retinol. 1 echiv.retinol=1 μg retinol=6 μg β - caroten
2) Exprimat în colecalciferol 10 μg colecalciferol=400 U.I. de vitamina D
3) Exprimat în echivalenţi de α - tocoferol, 1 mg α = tocoferol = 1 α - TE
4) Exprimat în echivalenţi de niacină. 1 NE (echiv.niacină) = 1 mg niacină sau 60 mg triptofan dietar.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul XV.7.

Defecte metabolice determinate de lipsa unor vitamine hidrosolubile cu rol coenzimatic

Vitamina	Boala	Defectul metabolic*
Biotina	Acidemie propionică	Propionil - CoA - carboxilaza
Vitamina B_{12}	Acidurie metilmalonică	Formarea de cobalamid-coenzimă
Acid folic	Malabsorbţia folatului	Transportul acidului folic
Niacina	Boala Hartnup	Transportul triptofanului
Piridoxina	Cistationinurie; homocistinurie	Cistationinaza; cistanioninsintetaza
Tiamina	Hiperalaninemie, acidoză lactică	Piruvat dehidrogenaza

* Defectele enzimatice pot fi corectate prin administrarea unor doze mari din vitaminele respective.

Deficienţele de vitamine liposolubile (avitaminozele respective) se întâlnesc, în special, la copii care nu au depozite adecvate în organism. La adulţi, deficienţele de vitamine liposolubile sunt rare. Când se întâlnesc, sunt aproape totdeauna datorate malabsorbţiei, obstrucţiei căilor biliare sau altor cauze care afectează metabolismul lipidelor.

XV.3.5. MINERALELE

Mineralele sunt substanţe nutritive care se află în raţia alimentară şi în organism, atât sub formă de compuşi anorganici cât şi organici. În general, se consideră că pentru nutriţia omului sănătos sunt absolut necesare 16 substanţe minerale.

Deşi substanţele minerale din organism reprezintă numai 4-5% din greutatea corpului, ele sunt indispensabile pentru menţinerea stării de sănătate.

În organism substanţele minerale împlinesc funcţii importante atât biochimice cât şi fiziologice. Ţinând seama de aceste roluri, se înţelege uşor necesitatea procurării regulate a mineralelor de către raţia alimentară. O raţie mixtă şi variată - cu alimente de origină animală şi vegetală - procură, totdeauna, substanţe minerale în cantităţi adecvate.

În ceea ce priveşte proporţiile, în organism unele minerale se găsesc în cantităţi mai mari (aport de cca 100 mg/zi). Ele sunt numite *macrominerale*. Din această categorie fac parte substanţele minerale care cuprind elementele: calciu, fosfor, sodiu, potasiu, clor şi magneziu. Principalele caracteristici biochimice şi rolurile fiziologice ale acestor elemente sunt rezumate în tabelul XV. 8.

Spre deosebire de macrominerale - care sunt necesare organismului în cantităţi de ordinul *miligramelor* - alte minerale se găsesc în cantităţi foarte mici, de ordinul *microgramelor*. Însă şi ele sunt absolut necesare pentru desfăşurarea în bune condiţiuni, a tuturor proceselor vitale. Aceste substanţe se numesc *oligominerale* iar elmentele corespunzătoare, *oligoelemente*. Sunt considerate esenţiale pentru organism următoarele oligoelemente: cromul cobaltul, cuprul, iodul, ferul, manganul, molibdenul, seleniul, zincul şi fluorul. În tabelul XV.9 sunt rezumate principalele caracteristici ale acestor oligoelemente.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul XV.8

Principalele caracteristici ale macromineralelor esenţiale

Elementul şi necesarul zilnic	*Sursele* [1]	*Metabolismul* [2]	*Funcţiile*	*Bolile sau simptomele deficienţei*[3]	*Bolile sau simptomele toxicităţii*
Calciul 800-1200 mg	Produse lacate, fasole, frunzele vegetalelor	Absorbţia necesită proteine care leagă calciu. Reglarea prin vitamina D, parathormon, calcitonină	Constituent al oaselor şi dinţilor; reglarea funcţiei nervoase şi musculare	Rahitism la copii Osteomalacie la adulţi Poate contribui la osteoporoză	Survine în caz de absorbţie excesivă datorită hipervitaminozei D, sau hipercalcemiei cauzată de hiperparatiroidism, sau hipercalcemia idiopatică
Fosforul 800-1200 mg	Boabe de cereale, fasole, mazăre, cartofi, morcovi; carne, peşte, pui, ouă	Controlează absorbţia vitaminei D. Nivelele serice sunt reglate de reabsorbţia rinichiului	Constituent al oaselor şi dinţilor, intermediarilor fosforilaţi metabolici, ATP, acizi nucleici	La copii rahitism La adulţi osteomalacie	Raportul Ca^{2+}/P_i redus în ser stimulează hipertiroidism secundar, poate conduce la pierdere de substanţă osoasă.
Sodiul 1100-3300 mg	Sare (clorura de sodiu), carne de vită, carne de pui; sfeclă, morcovi	Metabolismul său este reglat de aldosteronă	Cation principal în fluid extracelular. Reglează volumul plasmatic, echilibru acido-bazic, funcţia nervoasă şi cea musculară, Na^+/K^+ - ATP - aza	Necunoscute în cazul raţiilor normale. Deficienţa apare după diverse maladii sau răniri	Hipertensiune (la persoane susceptibile)
Potasiul 1875-5625 mg	Vegetale, fructe (nuci, banane, mere, struguri, portocale) boabe de cereale	Metabolismul său este reglat de aldosteronă	Cation principal în fluidul intraceular; implicat în funcţia nervoasă şi musculară, Na^+/K^+ - ATP - aza	Deficienţa de potasiu apare după răniri sau terapie cu diuretice; deficienţa de potasiu determină slăbirea tonusului muscular, paralizii, confuzii mentale.	Scăderea (oprirea) ritmului cardiac; ulcerul intestinului subţire
Clorul 1700-5100 mg	Sarea (clorura de sodiu)		Implicat în echilibrul lichidelor şi electroliţilor, component al sucului gastric	Deficienţa apare la copii mici hrăniţi cu raţii lipsite de sare. La adulţi deficienţa apare după vomismente, în caz de terapie diuretică şi în boli renale	
Magneziul 270-400 mg	În vegetale cu frunze verzi (conţinând clorofilă).		Constituent al oaselor şi dinţilor, cofactor enzimatic (kinaze, etc.)	Deficienţa apare după malabsorbţie sau diaree sau în caz de alcoolism	Scad mult reflexele tendoanelor şi reflexul respiraţiei

1) Alte surse sunt detaliate în Tabelul XV.19
2) În general, mineralele necesită pentru absorbţie proteine de transport.
Rareori absorbţia este completă; ea este afectată de alte substanţe nutritive din raţie (oxalaţi, fitaţi care chelează cationii bivalenţi). Transportul şi depozitarea necesită de asemeni proteine speciale. Excreţia are loc prin fecale (pentru mineralele neabsorbabile) şi prin urină, transpiraţie, bilă.
3) Aportul de minerale în exces produce simptome toxice şi simptome nespecifice, diaree, iritabilitate.

Tabelul XV.9

Principalele caracteristici ale micromineralelor (oligoelementelor) esenţiale

Elementul şi necesarul zilnic	*Sursele*[1]	*Metabolismul*[2]	*Funcţiile*	*Bolile sau simptomele deficienţii*	*Bolile sau simptomele toxicităţii*
Cromul 0,05-0,2 mg	Drojdia de bere, boabe de cereale, ulei de germene de porumb, carne, peşte.		Cr^{3+} constituent al "factorului de toleranţă al glucozei"	Reduce toleranţa la glucoză; deficienţă ca urmare a hrănirii parenterale	
Cobaltul 5-8 µg	Alimente de origină animală	Necesar formării moleculei de vitamină B_{12}	Necesar numai într-atât cât constituent al vitaminei B_{12}	Deficienţă de vitamină B_{12}	
Cuprul 1,3-3 mg	Legume verzi frunzoase, legume uscate, fructe (nuci, struguri); carne, crustacee	Transportat de albumină; legat la ceruloplasmină	Constituent al oxidazelor	Anemie hipocromă, microcitară; deficienţă după malnutriţie, sindromul lui Menke	Toxicitate rar întâlnită; deficienţă după maladia Wilson
Iodul 150 µg	Sare iodinată, animale marine	Înmagazinat în tiroidă ca tireoglobulină	Constituent al tiroxinei şi triiodtironinei	La copii: cretinism La adulţi: guşă, hipotiroidism, mixedem	Tirotoxicoză, guşă
Ferul 12-15 mg	Legume (pătrunjel, spanac, salată verde, varză), fructe (caise, nuci) ouă, carne	Transportat ca transferină; depozitat ca feritină sau hemosiderină, se pierde prin celule descuamate şi prin sângerări	Constituent al hemoglobinei şi al enzimelor care conţin hem/citocromi	Anemie hipocromă, microcitară	Sideroză; hemocromatoză ereditară
Manganul 2-5 mg	Legume verzi, boabe de cereale, carne, peşte, produse lactate, ceai		Cofactor pentru hidrolaze, decarboxilaze, transferaze. Participă la sinteza de glicoproteine şi proteoglicani	Deficienţă necunoscută la om	Intoxicaţiile prin inhalare produc simptome psihotice şi Parkinsonism
Molibdenul 75-250 µg	Legume verzi, unele cereale, carne (rinichi)			Deficienţă secundară; în urma hrănirii parenterale	
Seleniul 55-70 µg	Boabe de cereale, legume (roşii, ceapă)	Acţiune antioxidantă sinergică cu cea a vitaminei E	Constituent al glutation peroxidazei	Deficienţă slabă când solul este sărac în Se. Deficienţă secundară după nutriţie parenterală şi după malnutriţie proteică şi energetică	Megadozele determină pierderea părului, dermatite şi stare de iritabilitate
Zincul 12-15 mg	Carne (ficat), ouă, lapte; boabe de cereale, drojdie de bere		Cofactor pentru multe enzime: lactat dehidrogenaza, fosfataza alcalină, anhidraza carbonică	Hipogonadism, întârzierea creşterii şi a vindecării rănilor; scăderea simţurilor gustului şi mirosului; deficienţă după acrodermatita enteropatică şi după nutriţie parenterală	Iritaţie gastrointestinală, vomismente
Fluorul[3] 1,5-4 mg	Apa potabilă, ceai; alimente de origină marină		Măreşte rezistenţa oaselor şi a dinţilor	Carii dentare; osteoporoză (?).	Fluoroză dentară

1) Alte surse sunt detaliate în Tabelul XV.19
2) Aportul excesiv mineral determină simptome de toxicitate şi simptome nespecifice, diaree, iritabilitate.
3) Fluorul este esenţial pentru creşterea şobolanului. Deşi la om fluorul nu s-a dovedit a fi strict esenţial, fluorurile au un rol bine definit în prevenirea şi tratamentul cariilor dentare.

Trebuie subliniat faptul că mineralele se află în organism într-o strânsă şi continuă interfuncţionalitate. De aceea, intervenţia unei substanţe minerale sau a unui element afectează (stimulând sau inhibând) funcţionarea altor minerale. Acţiunile sinergice stimulative ale mineralelor se remarcă, în special, în stările de stres fizic sau emoţional. Dacă asemenea stări se prelungesc, aportul substanţelor minerale din raţia alimentară trebuie să fie mărit. S-a constatat, pe de altă parte, că persoanele cu aport energetic scăzut, datorită dietei urmate, vârstei sau stilului de viaţă sedentar, nu-şi pot împlini nevoile de substanţe minerale. În asemenea cazuri intervin sindroame mai mult sau mai puţin grave. În ultima vreme, deficienţele minerale - menţionate în Tabelele XV.8 şi XV.9 - au fost asociate cu o mare varietate de boli care au însă mai mulţi factori cauzali. Spre exemplu, boala de inimă coronariană a fost atribuită deficienţii de oligoelemente. Dar această atribuire nu poate constitui o cauză exclusivă căci, după cum se ştie, există mai mulţi factori care - împreună - trebuie consideraţi responsabili cauzali ai bolii. Oricum, până nu se vor elucida multiplele probleme referitoare la intervenţia şi necesarul nutritiv de oligoelemente, rămâne valabilă concepţia actuală potrivit căreia nutriţia minerală optimă a omului sănătos necesită consum de alimente cu conţinut mineral ridicat şi complet.

XV.3.6. SUBSTANŢELE ALIMENTARE BIOACTIVE

Într-o raţie alimentară obişnuită (completă) cea mai mare parte a aportului alimentar este de origină vegetală (legume, produse din cereale, fructe), în care predomină glucidele. Ele mai conţin însă şi alte principii nutritive: proteine, lipide, vitamine, minerale, apă, fibre alimentare precum şi substanţe bioactive.

Substanţele alimentare bioactive includ numeroase combinaţii chimice cu activitate biologică marcată şi care fac parte din diferite categorii de compuşi organici: alcooli, acizi, glicozizi, alcaloizi etc. În Tabelul XV.10 este prezentată o scurtă clasificare a unor categorii de substanţe alimentare bioactive, menţionându-se pentru fiecare categorie - după caz - exemple, însuşiri sau sursele vegetale care le cuprind şi din care pot fi procurate.

Tabelul XV.10

Unele categorii de principii alimentare bioactive

1. Enzime vegetale.
2. Fitohormoni (heteroauxina, hormon de creştere pentru plante).
3. Pigmenţi vegetali (carotenoizi, flavonoide)
4. Glicozizi (glicozizii cardiotonici, amigdalina, solamina).
5. Alcaloizi (cofeina, teofilina, teobromina, nicotina, chinina).
6. Uleiuri eterice şi răşini (mentă, portocale, mărar).
7. Acizi organici (din fructe şi legume - conferă gust acru).
8. Taninuri (imprimă gust astringent).
9. Substanţe antibiotice şi fitoncide (ceapă, usturoi, hrean).

Substanțele alimentare bioactive se găsesc în cantități relativ mari în numeroase plante medicinale folosite curent în scopuri farmacologice sub formă de ceaiuri (de mătase de porumb, cozi de cireșe, izmă, mușețel, sunătoare).

Cercetările moderne au arătat că substanțele alimentare bioactive influențează funcțiile unor organe interne în doze infinitezimale. Datorită efectelor multiple exercitate asupra ficatului, pancreasului, stomacului, intestinului, sistemului circulator, sistemului nervos, rinichiului, glandelor endocrine, prezența constantă în organism a principiilor bioactive este imperioasă. De aceea, rația zilnică trebuie să cuprindă alimente cât mai variate asigurându-se astfel procurarea acestor substanțe atât de necesare.

Este de remarcat faptul că multă vreme semnificația nutrițională a substanțelor bioactive nu a fost sesizată. Aceasta se datorează faptului că atât creșterea cât și dezvoltarea organismului nu sunt afectate de absența principiilor bioactive (așa cum sunt afectate de lipsa altor principii nutritive: proteine, glucide, lipide, vitamine, minerale). Pe de altă parte, în majoritatea alimentelor (vegetale) substanțele bioactive se găsesc în cantități mici și de aceea nu s-au putut decela decât folosind tehnici fine și precise.

XV.3.7. FIBRELE ALIMENTARE

Ca și substanțele nutritive bioactive, fibrele alimentare sunt principii de natură vegetală, aflate în rația obișnuită (completă) a omului. În general, această categorie de substanțe include principiile energetice ale hranei nedigerabile de către enzimele intestinale și neabsorbabile prin mucoasa intestinală. Cercetările au dovedit însă că în aceeași categorie a fibrelor alimentare pot fi cuprinse și substanțe de felul gumelor, gelurilor, mucilagiilor. Într-adevăr, deși acestea din urmă nu au o structură fibriiară ele prezintă o serie de proprietăți care justifică înglobarea în categoria fibrelor alimentare.

În decursul timpului, fibrele alimentare au fost clasificate după diverse criterii. Astfel, ținându-se seama de rolul pe care-l împlinesc în plantele cărora aparțin, fibrele vegetale (și totdată, alimentare) au fost grupate în trei mari categorii:

- fibre structurale (celuloza, lignina, unele hemiceluloze, pectine);
- gume și mucilagii;
- polizaharide de depozit.

Fibrele structurale intră în componența (structura) pereților celulari ai plantelor; gumele și mucilagiile au rol în reconstruirea regiunilor vegetale vătămate iar polizaharidele de depozit reprezintă rezervele nutritive ale plantelor.

Din punct de vedere al comportării lor față de acizi și baze, fibrele se împart în două grupe:

- fibre insolubile în acizi și baze (celuloza, lignina, unele hemiceluloze);
- fibre solubile în acizi și baze (pectine, unele hemiceluloze, gume, mucilagii, polizaharide de depozit).

Fibrele insolubile în acizi și baze se mai numesc „fibre brute". Această grupă este restrânsă, cuprinzând aproximativ jumătate din categoria fibrelor vegetale deoarece în cursul extracției (cu acizi sau cu baze) se îndepărtează aproape toți pentozanii: 80% din hemiceluloză, 90% din lignină și aproximativ un sfert (20-25%) din celuloză.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din punct de vedere al constituţiei lor chimice, fibrele vegetale se împart în următoarele categorii:

- Celuloza: polimer liniar al glucozei, format din circa 3000 unităţi;
- Hemicelulozele: polimeri polizaharidici diferiţi; mai mult de 2500, constituiţi din pentoze şi hexose;
- Pectinele: polimeri de acid galacturonic;
- Lignina: polimer de fenilpropan;
- Gumele, mucilagiile, polizaharidele de depozit: polizaharide foarte ramificate, nefibrilare, conţinând acid galacturonic, acid glucuronic, xiloză, arabinoză şi manoză;
- Alte substanţe eterogene: acid fitic, steroli vegetali, saponine, taninuri.

După cum rezultă din această clasificare, este de remarcat că majoritatea fibrelor vegetale care intră în raţia alimentară a omului sunt polimeri glucidici. Ultima categorie din clasificare nu cuprinde polimeri glucidici dar în intestin prezintă comportamente asemănătoare cu fibrele şi - de aceea - au fost grupate împreună.

Trecând în revistă fiecare categorie de fibre din ultima clasificare, este necesar să se facă unele precizări cu privire la proprietăţile lor mai importante.

Celuloza este insolubilă în apă şi nescindată de către enzimele tubului digestiv al omului. Enzimele din flora intestinală saprofită scindează, în unităţi structurale, cca. 15% din fibrele celulozice. Cu toate acestea, produşii rezultaţi nu sunt absorbiţi prin peretele intestinal.

Hemicelulozele. În intestin ele cu capacitatea de a reţine apa şi de a fixa (lega) unii cationi. Enzimele florei bacteriene din intestin hidrolizează cca 85% din hemiceluloză dar, ca şi în cazul celulozei, produşii rezultaţi nu sunt absorbiţi în organismul omului.

Pectinele pot forma geluri datorită unei mari hidrofilii pe care o au şi, la fel cu hemicelulozele, pot lega unii cationi sau acizi (acizii biliari din intestin). În intestinul gros, unele enzime aflate în flora saprofită scindează cca. 95% din pectină dar acidul galacturonic rezultat nu este absorbit în organism.

Lignina este un copolimer aromatic; deci nu este de natură glucidică. Se consideră că reprezintă componentul vegetal cel mai puţin digerabil. În alimente ea intră în proporţii diferite: se află în cantitate mai mare în cereale şi mai puţină în legume şi fructe. În intenstin lignina fixează sărurile biliare şi alte substanţe organice, ceea ce poate determina scăderea absorbţiei intestinale pentru alte principii nutritive.

După cum s-a mai menţionat, *gumele, mucilagiile, gelurile şi polizaharidele de depozit* nu au structură fibrilară (nu intră în constituţia peretelui celular al plantelor). În intestin ele au o capacitate redusă de fixare a cationilor dar, datorită absorbţiei apei, formează geluri care leagă acizii biliari sau alte substanţe organice.

În categoria *substanţelor vegetale nedigerabile* intră acidul fitic şi sărurile lui (fitaţii) care au capacitatea de a lega cationi. Astfel se pot explica unele pierderi digestive de fer sau zinc.

Din examinarea principalelor caractere ale categoriilor de fibre alimentare, cuprinse în ultima clasificare, se pot desprinde rolurile lor fiziologice, deosebit de favorabile, pe care le împlinesc în intestin: (1) absorbţia apei (în special, prin reţinere în ochiurile reţelei de fibre); (2) modificarea digestiei şi absorbţiei unor principii nutritive, explicată de faptul că gelul format de fibre face o filtrare selectivă, în funcţie de dimensiunile particulelor digerate; (3) modificarea tranzitului intestinal (durata tranzitului este invers proporţională cu cantitatea fibrelor alimentare din raţie); (4) absorbţia unor substanţe

organice toxice sau cu potențial carcinogenetic (în special, produșii rezultați din degradarea acizilor biliari sub acțiunea florei bacteriene); (5) legarea unor cationi (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}); (6) acțiunea hipolipemiantă (în special, scăderea concentrațiilor colesterolului și trigliceridelor din sânge). Reducerea absorbției lor intestinale, prin intervenția fibrelor vegetale, ar fi explicată de fixarea pe fibre a colesterolului și a acizilor biliari. (7) Fibrele mai solubile contribuie la atenuarea creșterii nivelului glucozei în sânge imediat după luarea mesei (datorată reducerii secreției insulinice).

Aportul insuficient de fibre alimentare în rație (mai mic de 20 g/zi) poate conduce, cu timpul, la instalarea unor afecțiuni grave, menționate în Tabelul XV. 11.

Se consideră că proporția optimă, necesară, de fibre alimentare în rația zilnică este de 30 g pentru persoane care depun efort fizic mediu și primesc prin rație 2700 Kcal/zi. Aportul de fibre alimentare trebuie să fie totdeauna direct proporțional cu aportul caloric al rației.

Asigurarea unui aport corespunzător de fibre alimentare se realizează prin introducerea în rația zilnică a legumelor, fructelor și prin consumarea de pâine făcută din făină integrală sau cu conținut bogat de tărâțe. Însă aportul de fibre alimentare nu trebuie să depășească 50 g/zi deoarece - datorită efectelor de absorbție și legarea ionilor în intestin - se pot produce pierderi de principii nutritive minerale (Zn, Mg, Fe, Ca) sau tulburări în utilizarea unor vitamine (B_6, B_{12}, C).

Tabelul XV.11

Afecțiuni datorate parțial consumului de rații sărace în fibre alimentare

Afecțiuni determinate de scăderea în volum a conținutului intestinal	*Afecțiuni metabolice determinate de scăderea cu 30% a aportului de fibre*
Colon iritabil	Cardiopatie ischemică
Constipație	Diabet
Cancer de colon	Obezitate
Diverticulită intestinală	Dislipemii
Apendicită cronică	Sarcină toxică
Varice	Litiază biliară
Hemoroizi	Carii dentare

XV.3.8. APA

Apa este socotită drept alimentul indispensabil care asigură în organism desfășurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive. Totodată, apa este cel mai abundent principiu nutritiv deoarece reprezintă cca 2/3 din greutatea corpului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În corpul unui adult sănătos şi aflat în condiţii normale se găsesc - în medie - 45 litri apă. Din aceasta se pierde aproximativ 3 litri zilnic prin excreţie, transpiraţie şi perspiraţie. Pierderile de apă ale organismului depind aproape total de natura activităţii depuse şi de condiţiile mediului înconjurător. Aceste pierderi pot fi cuprinse între cantităţi mai mici de 1 litru/zi la persoane sedentare aflate în climă temperată şi cantităţi mari, de cca 10 litri/zi, la persoane care desfăşoară munca la temperaturi ridicate. Dacă pierderile mari de apă nu se corectează imediat prin ingerări masive de apă, lapte, fructe şi zarzavaturi (Tabelul XV.12), în organism apar deficienţe severe cu repercusiuni foarte grave. Una dintre acestea este depleţia de sare (clorură de sodiu) care însoţeşte adesea deshidratările înaintate.

Tabelul XV.12

Conţinutul în apă al unor alimente şi băuturi aflate în raţia zilnică

Alimentul sau băutura	*Conţinutul în apă (%)*
Pâine albă	35,8
Morcov	88,2
Mere	84,37
Pere	83,83
Struguri	79,12
Pepene verde	94,96
Lapte total	87,4
Lapte smântânit	90,5
Vin	85,6
Bere	92,1
Ou (fiert)	73,7
Zahăr rafinat	0,5
Ulei	—

XV.4. PRINCIPALELE PRODUSE ALIMENTARE

Produsele alimentare cele mai importante şi frecvente în raţia omului se împart în două mari categorii:

1) produse alimentare de origine animală şi
2) produse alimentare de origine vegetală.

Această clasificare nu corespunde numai diferenţei de origine a produselor; ea ţine seama - totodată - şi de unele deosebiri în compoziţia chimică a alimentelor respective. Într-adevăr, cu excepţia laptelui, toate produsele alimentare de origine animală sunt lipsite aproape complet de glucide pe când cele de origine vegetală sunt bogate în glucide dar cuprind mai puţine proteine şi lipide.

Pe lângă aceste două mari categorii se consideră că există şi o a treia categorie (mai restrânsă) de produse alimentare şi care cuprinde: produsele zaharoase, băuturile şi condimentele.

Categoriile de produse alimentare menţionate sunt descrise în cele ce urmează.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XV.4.1. PRODUSELE ALIMENTARE DE ORIGINE ANIMALĂ

Laptele şi produsele lactate

Valoarea nutritivă a laptelui a fost recunoscută din cele mai vechi timpuri; el fiind considerat totdeauna drept un aliment complet. Într-adevăr, laptele conţine pe lângă cele trei categorii de principii imediate (proteine, lipide, glucide) importante minerale şi vitamine.

Proteinele. Acestea sunt: cazeina, lactoglobulina şi lactalbumina. Ultimele două proteine enumerate sunt constituite, fiecare, din mai multe fracţiuni. Dintre fracţiunile lactoglobulinice, mai bine cunoscută şi cercetată este β - lactoglobulina. Aceasta, împreună cu cazeina, reprezintă proteinele complete ale laptelui deoarece cuprind toţi aminoacizii esenţiali. Cazeina este o fosfoproteină care - în lapte - se află asociată cu calciu (cazeinat de calciu), fiind distribuită sub forma unei soluţii opalescente ce conferă, în parte, opacitatea albă a laptelui.

Lipidele. În lapte lipidele se găsesc distribuite sub forma unei emulsii foarte fine şi stabile. Ele sunt trigliceride, lecitine şi colesterol. Lipidele laptelui reprezintă cele mai gustoase şi - totodată - cele mai digerabile grăsimi cunoscute, diferind de toate celelalte prin compoziţie: cuprind toţi acizii graşi saturaţi cu număr par de atomi de carbon (de la C_4 la C_{24}) şi mulţi acizi graşi nesaturaţi.

Glucidele. Glucidul caracteristic al laptelui este lactoza (dizaharid constituit din glucoză şi galactoză). Lactoza este mai puţin dulce decât zaharoza.

Elementele minerale. Cele mai reprezentative elemente minerale din lapte sunt: calciul, fosforul, sodiul, potasiul şi clorul. În schimb, laptele cuprinde foarte puţin fer. Datorită acestui fapt, survine uneori anemia feripriva în cazul unui consum prelungit şi exclusiv lactat. Însă lipsa ferului din laptele matern nu dăunează sugarilor deoarece ei se nasc cu o rezervă de fer care le acoperă necesarul pentru aproximativ 6 luni. După acest timp, lipsa ferului din lapte poate fi suplinită de cel aflat în gălbenuşul de ou şi în preparatele făinoase cu care se suplimentează hrana sugarilor.

Vitaminele. Vitaminele laptelui aparţin ambelor categorii: liposolubile şi hidrosolubile. Dintre cele hidrosolubile predomină: riboflavina, piridoxina, niacina, acidul pantotenic şi vitamina B_{12}. Vitaminele liposolubile (A, D, E şi K) se află concentrate în fracţiunea grasă a laptelui. În schimb, laptele este sărac în tiamină şi vitamina C.

Proporţiile în care se găsesc în lapte diverşii constituenţi variază în raport cu specia de la care provine laptele respectiv (Tabelul XV.13).

Tabelul XV.13.

Compoziţia procentuală a laptelui provenit de la diferite specii

Specia	*Proteine*	*Grăsimi*	*Lactoză*	*Substanţe minerale (cenuşă)*
Femeie	1,0*	2,9	6,7	0,2
Vacă	3,7	3,5	4,5	0,75
Capră	4,2	4,1	4,6	0,8
Bivoliţă	4,3	8,2	5,0	0,8
Oaie	5,7	6,8	4,5	0,85

* Valorile din tabel sunt exprimate în grame pentru 100 ml lapte.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Datorită proporţiilor diferite de constituenţi este foarte greu să se înlocuiască laptele de hrană al unei specii cu laptele provenit de la altă specie.

Cu privire la compoziţia cantitativă a laptelui de femeie, menţionată în Tabelul XV.13, este de remarcat că ea se referă la cel cu care se hrănesc sugarii după câtva timp de la naştere (nu în primele zile). Imediat după naştere glanda mamară secretă colostrul care cuprinde o proporţie mai mare de proteine; cel puţin dublă decât laptele obişnuit. Dintre proteinele care predomină în colostru se remarcă lactoglobulinele, considerate aproape identice cu γ - globulinele din plasmă. În această fracţiune globulinică din lapte se găsesc numeroşi anticorpi protectori, ceea ce explică imunitatea conferită de laptele matern pentru nou-născuţi.

Pe lângă lapte, ca atare, în hrana omului intră şi unele produse lactate.

Principalele produse lactate folosite în alimentaţie sunt: smântâna, untul, brânza şi produsele lactate acide.

Smântâna. Dacă laptele proaspăt nu se fierbe ci se păstrează câtva timp, fără a-l agita, se observă că grăsimea pe care o cuprinde se concentrează la suprafaţă sub forma unei pături. Aceasta este smântâna care conţine 30-35% lipide. Odată cu lipidele, în smântână se concentrează şi vitamina A din lapte. Alături de aceasta, smântâna mai cuprinde şi alţi constituenţi ai laptelui (proteine, săruri, lactoză).

Untul. Prin agitarea dirijată a smântânei se separă lipidele, constituind untul. El conţine peste 80% din lipidele laptelui. Totodată, în unt este concentrată aproape întreaga cantitate de vitamină A din lapte. Bineînţeles, ca şi smântâna, untul mai cuprinde şi proteine, săruri, lactoză.

Brânza se obţine prin separarea cazeinei (asociată cu o cantitate mai mare sau mai mică de lipide) din lapte. Există diverse varietăţi de brânză (de vacă, de burduf, caşcaval, schweitzer) obţinute în condiţii deosebite de preparare. În compoziţia brânzei (de orice fel) intră următoarele substanţe: apă (25-40%), proteine (16-26%), lipide (18-30%), substanţe minerale (0,5-4%) şi foarte puţine glucide.

Produsele lactate acide. În această categorie intră: laptele bătut şi iaurtul.

Aceste produse lactate acide au o deosebită valoare nutritivă; cu totul asemănătoare celei a laptelui dulce iar constituenţii se află sub forme uşor asimilabile. Pentru acest motiv ele sunt folosite mult atât în alimentaţia omului sănătos cât şi a unor bolnavi.

Ouăle

Aşa cum laptele este alimentul complet şi special produs pentru hrana mamiferului tânăr, tot astfel oul de pasăre reprezintă alimentul complet şi anume alcătuit pentru embrionul de pasăre. In cele menţionate aci, se fac referiri numai la constituţia oului de găină care - după cum se ştie - pe lângă faptul că asigură dezvoltarea embrionului de pui, reprezintă şi un excelent aliment pentru om.

Oul (de găină) este constituit din coajă (11%), albuş (59%) şi gălbenuş (30%). Partea sa comestibilă (albuşul şi gălbenuşul împreună) cuprinde: proteine 13%, lipide 11,8% glucide 1% şi săruri minerale 0,8%.

Deoarece albuşul conţine 88% apă el poate fi considerat drept o soluţie de proteine şi săruri. Majoritatea proteinelor din albuş este formată din albumine; în cantitate mai

mare se află ovalbumina iar în proporţie mai mică ovomucoidul şi avidina. Aceasta din urmă formează o combinaţie complexă, stabilă, cu biotina împiedicând-o să-şi exercite acţiunea sa vitaminică. Însă prin fierbere avidina se denaturează şi ea. In felul acesta, albuşul coagulat (întărit) nu mai păstrează capacitatea de a inhiba biotina.

Gălbenuşul este mai consistent decât albuşul (conţine 49% apă). Gălbenuşul se deosebeşte de albuş şi printr-un conţinut mare de lipide şi vitamine. Lipidele din gălbenuş (33%) sunt în marea lor majoritate (30%) fosfolipide iar restul (cca. 3%) colesterol aflat în stare emulsionată. Fosfolipidele din ou sunt de tip lecitine, bogate în colină şi acizi graşi nesaturaţi. Gălbenuşul cuprinde şi el proteine importante, complete, conţinând toţi aminoacizii esenţiali. Dintre elementele minerale, în gălbenuş predomină: calciul, fierul, fosforul (ca fosfaţi), sulful, potasiul, iodul, manganul şi cuprul. Gălbenuşul este - totodată - şi o bogată sursă vitaminică. El conţine vitaminele liposolubile A, D, E iar dintre cele hidrosolubile predomină vitaminele B_2 şi B_6. Gălbenuşul nu conţine însă vitamina C.

Carnea

Valoarea nutritivă şi compoziţia chimică a cărnii, cu care se hrăneşte omul, variază relativ puţin în raport cu specia de la care ea provine. De aceea, consideraţiile făcute aici privesc deopotrivă carnea de vacă, viţel, berbec, miel, porc şi pasăre (Tabelul XV.14).

Tabelul XV.14

Conţinutul cărnii în apă, principii imediate şi substanţe minerale

Specia de provenienţă a cărnii	*Apă*	*Proteine*	*Lipide*	*Glucide*	*Substanţe minerale*
Vacă	39*	17,4	8,3	0,3	0,194
Viţel	64	17,1	7,4	0,3	0,224
Berbec	43	14,1	18,2	0,2	0,677
Miel	77	20,1	2,2	-	-
Porc	33	10,1	13,7	0,2	0,607
Gâscă	70	16,4	31,5	-	0,817
Găină	70	21,6	2,7	-	0,243
Raţă	72	16,0	28,6	-	0,661

* Valorile consemnate în tabel reprezintă procente din produsul analizat.

Cel mai important constituent al cărnii este reprezentat de proteine iar dintre ele, cea mai valoroasă este miozina care predomină în ţesutul muscular. Miozina este o proteină completă şi de valoare nutritivă egală cu cea a proteinelor din lapte şi ouă. Se consideră că, practic, carnea nu conţine glucide. În realitate, ea cuprinde cantităţi foarte mici (sub 0,5%) de glucide iar ficatul conţine cantităţi apreciabile de glicogen.

Dintre *minerale*, carnea cuprinde - în genere - mult fosfor (ca şi gălbenuşul) dar puţin calciu (a 10-a parte din cel aflat în lapte). În schimb, carnea conţine cantităţi mai mari

de potasiu, clor şi sodiu. În proporţii mai mici - dar totdeauna prezente - în carne se găsesc elementele minerale fer şi cupru.

Printre *vitaminele* din constituţia cărnii se remarcă cele din complexul B (în special, tiamina, riboflavina şi niacina). Carnea conţine puţine vitamine liposolubile şi vitamină C. Numai ficatul animalelor menţionate în Tabelul XV.14 cuprinde proporţii mai mari de vitamine liposolubile şi cantităţi importante de riboflavină precum şi de vitamină B_{12}.

Peştele

Ţesutul muscular al peştilor este constituit din aceleaşi substanţe ca şi cel provenind de la animalele menţionate anterior (Tabelul XV.14) iar proporţiile în care intră majoritatea principalilor constituenţi ai cărnii de mamifer sau pasăre şi ai celei de peşte sunt mult apropiate (Tabelul XV.15). Există însă deosebiri în ceea ce priveşte proporţia de lipide deoarece carnea de peşte conţine - în genere - puţine substanţe grase. Totuşi, unele varietăţi de peşte fac excepţie din acest punct de vedere; spre exemplu, scrumbiile conţin cca 13% lipide. În lipidele peştilor predomină acizii graşi superiori nesaturaţi. Pentru acest motiv peştele este considerat o sursă excelentă de *acizi graşi esenţiali*. Majoritatea proteinelor din ţesutul muscular al peştilor sunt de natură superioară, cuprinzând aproape toţi *aminoacizii esenţiali* iar elementele minerale sunt din cele mai valoroase pentru organismul uman. În funcţie de natura peştilor (de apă dulce sau marini), elementele minerale predominante sunt diferite. Astfel, peştii de apă dulce conţin - în special - magneziu, fosfor, fer şi cupru iar cei de apă sărată sunt bogaţi în iod, fluor, cobalt, vanadiu şi zinc. Ficatul anumitor peşti (morrhua, ton albastru) reprezintă o preţioasă sursă naturală de vitamine A şi D. Dintre vitaminele hidrosolubile, carnea de peşte cuprinde în special: niacina, vitamina B_1 şi B_2.

În Tabelul XV.15 sunt prezentate valorile procentuale în care se găsesc principalele substanţe nutritive din constituţia ţesutului muscular al unor peşti de apă dulce şi marini.

Tabelul XV.15

Constituenţii principali ai ţesutului muscular de peşte

Felul peştelui		Apă	Proteine	Lipide	Glucide	Substanţe minerale
Categoria	Denumirea					
De apă dulce	Crap	33*	7,5	3,9	-	0,121
	Ştiucă	-	18,7	0,6	-	0,772
	Păstrăv	-	19,2	0,1	-	0,760
De apă sărată	Morun	38	16,5	0,4	-	0,783
	Scrumbie	35	18,7	12	-	0,827
	Calcan	-	14,9	10,5	-	0,721

* Valorile din tabel reprezintă procente din produsul analizat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din datele Tabelului XV.15, precum şi din cele menţionate anterior, rezultă că includerea peştelui în raţia alimentară a omului este cât se poate de indicată. Trebuie luate însă precauţii privind consumarea sa deoarece carnea de peşte se alterează foarte uşor.

XV.4.2. PRODUSELE ALIMENTARE DE ORIGINE VEGETALĂ

Se obişnuieşte a se grupa alimentele de origină vegetală în următoarele trei mari categorii: (1) cereale, (2) legume şi (3) fructe. La rândul lor, legumele şi fructele se grupează în mai multe subcategorii.

Cerealele

Cerealele folosite de obicei pentru hrana omului sunt: grâul, porumbul, orezul şi secara. Deoarece în alimentaţie se folosesc preparate care au la bază făina obţinută din boabele (seminţele) cerealelor, în cele ce urmează se fac - mai întâi - unele consideraţii cu privire la constituţia boabelor.

Constituenţii principali ai seminţelor (boabelor) de cereale sunt: apa (11%), proteine (11%), glucide (70%) şi minerale 2%. Procentul de lipide este variabil: 0,5 - 8%.

Proteinele fac parte din categoria celor simple şi anume: prolamine, globuline, albumine, gluteline şi gliadine.

Lipidele cerealelor conţin cantităţi apreciabile de trioleină şi, de aceea, se găsesc sub formă lichidă la temperatura obişnuită.

Glucidele sunt reprezentate, în cea mai mare parte, de amidon şi - într-o proporţie mai mică - de celuloză.

Elementele minerale sunt localizate atât în straturile de înveliş ale bobului cât şi în embrion. Cele mai abundente sunt: potasiu, magneziu, calciu şi fosfor. Ultimele două elemente minerale citate se află, în parte, sub formă de acid fitic (hexafosfatul inozitolului). Acidul fitic - ca atare - nu este utilizat de către organismul omului; de asemeni, el împiedică absorbţia calciului. Pentru acest motiv, se consideră că cerealele au un efect anticalcifiant. Există însă unele cereale (grâu, secară) care conţin o enzimă (fitaza) capabilă să hidrolizeze acidul fitic, diminuând astfel efectul anticalficiant.

Orezul este cereala cea mai săracă în proteine, lipide şi minerale. În schimb, bobul de orez este foarte bogat în amidon (cca. 80%).

Porumbul este o cereală cu bobul bogat în lipide (cca. 4%). Din embrionul bobului de porumb se extrage aşa - numitul ulei de germene de porumb, cu mare valoare nutritivă deoarece conţine acizi graşi polinesaturaţi, esenţiali. Proteina principală din porumb este zeina cu conţinut scăzut în aminoacizi esenţiali, fiind lipsită complet de triptofan şi lizină. Pentru acest motiv, ea este considerată o proteină cu valoare biologică redusă. De asemeni, porumbul este sărac în vitamine din complexul B.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Făina şi pâinea

Pentru prepararea făinii albe (70% extracţie) se îndepărtează - în timpul măcinatului - tărâţa şi germenele (în proporţie de 30%). Făina integrală se obţine prin măcinarea întregului bob.

Pentru ca să poată servi ca aliment, făina - care conţine amidon insolubil - trebuie să devină uşor digerabilă. Modul cel mai potrivit de realizare a acestui deziderat este transformarea sa în pâine (panificaţia). Panificaţia se bazează pe proprietatea glutenului (constituit din gliadină şi glutelină) de a forma cu apa o cocă. În procesul panificaţiei coca „creşte", adică îşi măreşte volumul şi devine afânată reţinând în masa ei dioxid de carbon produs de fermentaţia alcoolică a glucozei sub acţiunea drojdiei de bere. La rândul său, glucoza provine din amidon sub acţiunea amilazei din făină. Prin coacere, coca crescută se întăreşte luând aspectul spongios al pâinii. Totodată, în timpul coacerii o parte din amidonul insolubil al făinii este transformat în amidon solubil şi dextrine care reprezintă compuşi uşor digerabili.

În afară de pâine, din făină se mai fac şi alte preparate (făinoase şi de patiserie) care intră în alimentaţia curentă a omului: macaroane, tăiţei, biscuiţi, cozonac, prăjituri etc.

Legumele

Legumele constitue o categorie de vegetale folosite mult în alimentaţie deoarece cuprind numeroase substanţe nutritive şi pot fi preparate în moduri foarte variate. Spre deosebire de alte categorii de vegetale, legumele oferă - ca parte comestibilă - fie una din regiunile lor constitutive (rădăcina, tulpina, bulbul, florile, fructele, seminţele, frunzele) fie plantele în întregime.

Din punct de vedere al compoziţiei lor chimice, legumele conţin multă apă (75-95%), glucide (1-2%) şi cantităţi reduse de proteine precum şi de grăsimi. În schimb, legumele cuprind proporţii importante de vitamine şi elemente minerale.

Legumele sunt grupate în 10 clase: (1) rădăcinoase, (2) bulbifere, (3) tuberculifere, (4) vărzoase, (5) fructoase, (6) păstăioase şi boabe (leguminoase), (7) frunzoase, (8) condimentare (9) perene şi (10) ciuperci comestibile. Aceste categorii - ilustrate prin exemple - şi cu specificarea constituenţilor caracteristici sunt consemnate în Tabelul XV.16.

Fructele

Fructele sunt alimente de origină vegetală care au o valoare energetică aproape dublă faţă de cea a legumelor. Această proprietate este datorată conţinutului lor bogat în glucide: zaharuri simple (glucoză, fructoză), zaharoză şi amidon în fructele tropicale (banane). Fructele conţin şi multe vitamine precum şi elemente minerale. Proteinele şi lipidele nu intră decât în cantităţi foarte mici în compoziţia fructelor. Însă unele fructe (nuci, măsline) conţin multe lipide şi, de aceea, sunt folosite pentru extragerea uleiurilor respective.

Cu excepţia vitaminelor, în Tabelul XV.17, sunt menţionaţi constituenţii principali ai unor fructe folosite curent în alimentaţia omului.

Datorită compoziţiei lor bogate în elemente nutritive fructele trebuie să fie nelipsite în raţia alimentară, completă, a omului. Eficienţa maximă o are consumul de fructe proaspete căci oricare ar fi formele de conservare, acestea contribuie la pierderea unora din principiile lor nutritive. Cu privire la consumul fructelor proaspete este preferabil să se mănânce cele bine coapte căci conţin proporţii mai mari de zaharuri simple, asimilabile uşor, faţă de fructele necoapte (verzi). Dacă din cauza unor afecţiuni este indicat numai consumul fructelor sub formă de compot, fierberea trebuie să fie rapidă, evitându-se pierderile de substanţe nutritive.

Tabelul XV.16

Principalele categorii de legume folosite în raţia alimentară şi constituenţii lor caracteristici

Categoria de legume	*Exemple*	*Constituienţi caracteristici*	*Utilizări şi acţiuni*
1	*2*	*3*	*4*
Rădăcinoase	morcov	vitamine: B_1, B_2; caroten elemente minerale: Fe, Cu, Ca, P (fosfat) substanţe pectice	Se foloseşte în tratamentul colitei
	pătrunjel	vitamina C uleiuri volatile, eterice	plantă condimentară
	păstârnac	uleiuri volatile, eterice vitamine: B_1, B_2, C	plantă condimentară
	ţelină	vitamine: A, complex B.C. săruri de calciu substanţe aromate	are acţiune diuretică (ceai)
	ridichi	vitamine: B_1, B_2, C; compuşi sulfuraţi specifici	au acţiune diuretică
	sfeclă	glucide vitamine: B_1, B_2, C minerale: K, Ca, P radicali metil liberi	constituienţii iau parte la diverse biosinteze în organism şi procese de detoxifiere în ficat
Tuberculifere	cartof	amidon asparagină, tuberina (proteină) vitamina C; Fe	aliment de bază hidrocarbonat (substituent al cerealelor)
Bulbifere	ceapă usturoi praz	glucide vitamine: complex B, C uleiuri volatile elemente minerale: Ca, P	vermifug vermifug acţiune colagogă

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1	2	3	4
Vărzoase	varză	substanțe tioanogenetice vitamina C, minerale: Ca	împiedică fixarea iodului în tiroidă
	gulie conopidă	vitamine: complex B,C,K minerale: Ca, K	
Fructoase	pătlăgele vinete tomate ardei	caroten, vitamine B_1, B_2, C minerale: Fe,K,Ca,Mg,P,Cl	
	castraveți	ascorbatoxidaza: descompune vit. C	valoare nutritivă redusă
	dovlecei	minerale	
Păstăioase și leguminoase	fasole, mazăre, linte, bame, soia	caroten și vitamine B_1, B_2, C, E, PP minerale: Ca, K, P, Fe, Mg proteine glucide (în formele uscate) și lipide: acizi grași esențiali	
Frunzoase	spanac, salată verde, lobodă, măcriș	vitamine: B_1, B_2, E, K caroten minerale: Fe, P, Ca, Cu, K	
Condimentare	Piper, muștar, boia, usturoi, ceapă, praz, hrean, chimen, cimbru, leuștean, mărar, tarhon, pătrunjel, dafin, scorțișoară, vanilie, anason	uleiuri eterice cu mirosuri aromate	Folosite în formă proaspătă și uscată la prepararea mâncărurilor și produselor zaharoase
	sarea de bucătărie	Cl, Na, Mg, Ca, I	
Perene	Sparanghel		diuretic
	Anghinare		efect colagog
	Hreanul	glucide vitamina C enzime (peroxidaza) minerale: K, Ca, Mg, Fe	
Ciuperci comestibile	Diverse varietăți	apă minerale:K, P, Fe, Ca, Mg, Cu, Na vitamine: A, B_1, B_2, C, D proteine lipide	
	Drojdia de bere	foarte bogată în vitamine din complexul B	

Tabelul XV.17

Principiile nutritive din constituţia unor fructe

Fructe	Apă	Proteine	Lipide	Glucide		Substanţe minerale
				fără celuloză	celuloză	
Mere	84,37*	0,40	-	12,13	1,98	0,42
Pere	83,83	0,35	-	9,16	-	0,29
Prune	82,78	0,66	-	10,08	5,41	0,71
Vişine	80,57	1,29	0,43	11,17	-	0,52
Struguri	79,12	1,01	-	15,21	-	0,48
Portocale	84,26	1,08	-	6,08	6,08	-
Pepene verde	94,96	0,72	0,06	4,13	0,10	0,28
Pepene galben	91,50	0,83	0,13	6,35	0,66	0,52
Căpşuni	86,99	0,59	0,45	0,24	2,32	1,82
Zmeură	85,12	0,40	-	5,33	2,92	0,49

* Valorile consemnate în tabel reprezintă procente din produsul analizat.

XV.4.3. ALTE PRODUSE ALIMENTARE

Aşa cum s-a mai menţionat, o grupă mică de produse alimentare cuprinde: produsele zaharoase, băuturile şi condimentele. Ele fac parte din raţia completă a omului deşi nu cuprind principii nutritive într-o proporţie apreciabilă; comparabilă cu produsele de origine animală sau vegetală.

Produsele zaharoase

Aceste produse sunt dulciuri concentrate şi caracterizate prin conţinutul lor în zaharuri cu moleculă mică (glucoza, fructoza, zaharoza) care le conferă gustul dulce, plăcut. Sunt uşor digerabile şi absorbabile iar în urma metabolizării eliberează cantităţi relativ mari de energie. În compoziţia produselor zaharoase mai pot intra: mierea, amidonul, laptele, diverse grăsimi (unt, margarină), seminţe de plante (alune, nuci), fructe (conservate în zahăr sau alcool) gemuri, gelatină, substanţe aromate, coloranţi (naturali sau artificiali).

Produsele zaharoase se clasifică - la rândul lor - în următoarele categorii: dulciuri, preparate din zahăr şi fructe, produse din zahăr şi seminţe oleaginoase, mixturi complexe.

Dulciurile. Acestea sunt constituite din glucide pure. Exemple: zahăr, miere, bomboane, rahat.

Preparate din zahăr şi fructe. În această categorie intră: dulceaţa, gemul, fructele zaharisite, jeleul.

Produse din zahăr şi seminţe oleaginoase. Exemple de asemenea produse sunt: ciocolata şi halvaua.

Mixturi complexe. Acestea sunt produse de cofetărie: checuri, fursecuri, torturi, îngheţată.

Băuturile

Băuturile consumate curent sunt grupate în două categorii: băuturi alcoolice şi băuturi nealcoolice.

Băuturile alcoolice. În funcţie de materia primă din care provin, modul de preparare şi proporţiile de alcool etilic conţinut, băuturile alcoolice sunt foarte variate. Deşi alcoolul etilic - pe care-l cuprind - posedă o valoare energetică apreciabilă (7 kcal/g), datorită acţiunilor sale farmacologice devine, repede, nociv organismului. De aceea, consumul băuturilor alcoolice trebuie să fie restrâns.

Băuturile alcoolice consumate frecvent sunt: vinul, berea, lichiorurile. În afară de aport calorigen, valoarea nutritivă a băuturilor alcoolice este discutabilă.

Băuturile nealcoolice. Aceste băuturi au valori nutritive evidente şi de aceea sunt utilizate curent.

Băuturile nealcoolice care se consumă mai mult sunt: apa potabilă, apele minerale, sifonul, ceaiurile medicinale, sucurile de fructe şi de legume, nectarul, siropurile de fructe, diverse băuturi cu efecte stimulente (ceai, cafea, cacao).

Dintre băuturile nealcoolice, valoare nutritivă deosebită au sucurile de fructe şi de legume. Ele păstrează în compoziţie principiile nutritive ale plantelor (fructe sau legume) din care provin: glucide, săruri minerale, vitamine şi diverse substanţe bioactive. Pentru acest motiv, multe din ele sunt indicate şi în tratamentul unor afecţiuni.

Condimentele

Condimentele au valoare nutritivă foarte redusă (practic, nulă) dar – datorită compoziţiei lor bogate în substanţe aromatizante – sunt folosite la prepararea alimentelor şi a multor produse zaharoase.

În funcţie de gustul pe care-l conferă, condimentele sunt grupate în 5 categorii:

- *Condimente acide*: oţet, acid citric, acid tartric.
- *Condimente picante:* piper, muştar, boia.
- *Condimente aromate*: chimen, cimbru, tarhon, leuştean, mărar, pătrunjel, dafin, vanilie, anason
- *Condimente aliacee*: usturoi, ceapă, praz, hrean.
- *Condimente saline:* sarea de bucătărie

Constituienţii unora dintre aceste condimente sunt menţionaţi în Tabelul XV.16.

XV.4.4. ALIMENTE BOGATE ÎN AMINOACIZI ESENŢIALI

În subcapitolul privind proteinele, ca o categorie de principii nutritive, s-a subliniat faptul că prezenţa şi proporţia echilibrată a aminoacizilor esenţiali în produsele alimentare din raţie joacă roluri decisive în creşterea organismelor tinere şi în menţinerea stării de întreţinere a organismului adult.

Alimentele de felul: produse lactate, carne (de vită, porc, pasăre), peşte, au un conţinut ridicat de proteine care cuprind aminoacizi esenţiali în proporţii apreciabile şi echilibrate, corespunzătoare nevoilor organizmului. În schimb, după cum reiese din Tabelul XV.18, multe legume şi fructe conţin proteine care cuprind cantităţi foarte mici sau sunt lipsite complet de unii aminoacizi esenţiali. Acest fapt face ca nici restul aminoacizilor esenţiali din proteinele legumelor sau fructelor respective să nu mai fie utilizat pentru refaceri tisulare ci numai în scop energetic. Neajunsul poate fi însă corectat prin asocierea în raţie a produselor alimentare cuprinzând proteine sărace în aminoacizi esenţali (sau lipsite de anumiţi aminoacizi esenţiali) cu alimente care conţin proteine complementare; adică bogate în aceeaşi aminoacizi esenţiali. Prin asemenea

combinări potrivite se reuşeşte să se acopere necesarul nutritiv al organismului cu proteine utilizabile. De fapt, unul din cele mai importante deziderate în alcătuirea raţiilor alimentare cu conţinut proteic cât mai util este reprezentat de echilibrarea aminoacizilor esenţiali.

Tabelul XV. 18

Conţinutul în aminoacizi esenţiali al unor alimente

Alimentul		Cantitatea (g)	Conţinutul proteic (g)	Aminoacizi esenţiali (mg)							
Categoria	*Denumirea*			Trp	Leu	Lys	Met	Pha	Isl	Val	Thr
Cereale	Făina de grâu	110	7,0	119	437	416	134*	296	267	394	282
	Tărâţa de grâu	29	4,6	74	273	190	56*	167	185	213	130
	Germenele de grâu	6	1,8	16	110	99	26*	58	76	88	86
	Orez	191	13	140	1107	503	230*	643	604	900	503
Ou	Albuş	31	3,4	51	296	204	133*	214	218	262	150
	Gălbenuş	17	2,72	39	235	185	70*	123	171	190	140
Lapte	Unt	246	8,9	90	809	678	188*	433	514	613	384
	Caimac (smântână)	64	23	320	2260	1780	570*	1095	1461	1575	1073
	Iaurt	250	4,3	93	842	706	196*	450	536	638	400
Peşte	Hering	453	91	924	6930	8040	2681*	3420	4711	4896	3973
	Scrumbie	453	47	957	7178	8326	2775*	3541	4785	5072	4115
Carne	Vacă										
	Vacă ficat	453	120	1354	8398	6772	2167*	4515	3786	5689	4334
	Vacă creer	453	47	625	3828	3443	997*	2292	2283	2428	2238
	Porc										
	Porc costiţă	453	137	381	3048	2476	610*	1829	1676	1829	1295
	Porc ficat	453	93	1410	8686	7005	2242*	4670	4950	5884	4484
Fructe	Măr	130	0,26	-*	17	14	5	12	19	12	10
	Caisă	38	0,38	-*	68	68	13	38	41	56	48
	Cantalup	100	0,70	1	-*	18	2	-*	-*	-	-*
	Curmală	10	0,22	6	8	7	3*	6	7	9	6
	Smochină	38	0,46	20	103	95	20*	57	72	91	76
	Portocală	180	1,8	5	-*	48	5	-*	-	-	-*
Legume	Fasole verde	125	2	28	116	104	30*	48	90	96	76
	Morcov	100	1,1	9	59	48	9*	38	42	51	40
	Salată verde	100	0,3	13	-*	75	4	-*	-*	-*	-*
	Cartof	100	2,1	36	120	99	38*	116	101	157	99
	Tomată	240	2,4	22	98	101	17*	67	70	67	79
	Tomată (suc)	200	1,8	16	74	76	12	50	52	50	60

* Aminoacid esenţial limitant.

XV.4.5. REPARTIZAREA UNOR PRINCIPII NUTRITIVE ÎN CELE MAI IMPORTANTE PRODUSE ALIMENTARE

La încheierea studiului principiilor nutritive (în subcapitolul 3) şi după descrierea celor mai importante produse intrând în alcătuirea raţiei zilnice a omului (expusă în acest subcapitol), este util să se facă o prezentare sinoptică a relaţiilor de strictă dependenţă dintre cele două categorii de substanţe alimentare. În acest scop s-a întocmit Tabelul XV.19.

Cercetarea Tabelului XV.19 permite - totodată - şi evidenţierea unui nou criteriu de grupare posibilă a produselor alimentare; anume, în funcţie de conţinutul lor în principii nutritive. Într-adevăr, din Tabelul XV.19 se desprinde clar că majoritatea principiilor nutritive intră în constituţia anumitor alimente; indiferent de provenienţa lor animală sau vegetală. Un număr mai redus de principii nutritive se găsesc în alte alimente iar în câteva alimente se află şi mai puţine principii nutritive.

Tabelul XV.19

Repartizarea principiilor nutritive în cele mai importante produse alimentare

Principii nutritive	*Produse alimentare*
Apa	Băuturi, fructe, legume
Glucide	Zahăr, sirop, miere, boabe de cereale, fructe, legume
Lipide	Unt, margarină, uleiuri vegetale, grăsimile din carne, produse lactate, nuci, seminţe de plante oleaginoase
Proteine	Carne (de vită, de porc, de pasăre), peşte, ouă, lapte şi produse lactate, boabe (seminţe) de cereale
Vitamine	
Vitamina A	Ficat, ouă, ulei de ficat de peşte, lapte şi produse lactate, fructe şi zarzavaturi
Tiamina	Drojdia de bere, boabe (nedecorticate) de cereale, carne, peşte, pui, gălbenuş de ou, nuci, legume
Riboflavina	Drojdia de bere, boabe de cereale, carne (organe), gălbenuş de ou, nuci, legume
Piridoxina	Drojdia de bere, boabe de cereale, germene de grâu, carne, legume cu frunze verzi comestibile
Niacina	Carne (slabă), pui, peşte, drojdie de bere, lapte şi produse lactate, orez nedecorticat
Vitamina B_{12}	Carne (organe) peşte, ouă, brânză
Biotina	Gălbenuş de ou, ficat, orez nedecorticat, drojdie de bere, boabe de cereale, legume
Inozitol	Boabe de cereale, drojdie de bere, carne, lapte, nuci, fructe citrice, zarzavaturi
Acid folic	Frunze verzi şi rădăcini de zarzavaturi, carne (organe), drojdie de bere, boabe (nedecorticate) de cereale, lapte
Acid pantotenic	Carne (organe), gălbenuş de ou, drojdie de bere, boabe de cereale, germene de grâu, legume
Vitamina C	Fructe citrice, cantalup, pepene verde. căpşuni, tomate
Vitamina D	Peşte (sardele, heringi), lapte şi produse lactate, carne (organe), făină de oase, gălbenuş de ou
Vitamina E	Germene de grâu, ouă, carne (organe), uleiuri vegetale, cartofi, frunze verzi de zarzavaturi
Vitamina K	Frunze verzi de zarzavaturi, gălbenuş de ou, fasole soia
Bioflavonoide	Fructe citrice
Elemente minerale	
Calciu	Lapte şi produse lactate, legume cu frunze verzi, făină de peşte
Clor	Sare, carne, măsline, făină de secară
Cobalt	Carne (organe), pui, lapte, legume cu frunze verzi, fructe
Crom	Ulei de germene de porumb, boabe nedecorticate de cereale, drojdie de bere
Cupru	Carne (organe), legume, nuci, struguri
Fer	Carne, pui, peşte, ouă, legume cu frunze verzi, fructe uscate
Fluor	Ceai, apă fluorinată, făină de oase
Fosfor	Carne, peşte, pui, ouă, lapte şi produse lactate, legume, boabe de cereale, nuci
Magneziu	Boabe nedecorticate de cereale, legume verzi, nuci
Mangan	Boabe nedecorticate de cereale, legume cu frunze verzi, nuci, gălbenuş de ou
Molibden	Legume, lapte, ficat
Potasiu	Carne (slabă), boabe nedecorticate de cereale, seminţe de floarea soarelui, legume, fructe uscate
Seleniu	Peşte (heringi), drojdie de bere, boabe nedecorticate de cereale, germene de grâu
Sodiu	Sare, produse lactate, ţelină
Sulf	Peşte, ouă, carne, varză
Vanadiu	Peşte
Zinc	Carne (organe), drojdie de bere, fasole soia

XV.5. CONTRIBUŢIA NUTRIŢIEI LA PĂSTRAREA SĂNĂTĂŢII

Din prezentarea noţiunilor esenţiale de nutriţie, expuse în acest capitol, se poate detaşa cu uşurinţă ideea că raţia alimentară corespunzătoare necesităţilor organismului este cea care conţine alimente variate şi cu concentraţii mari de principii nutritive. Majoritatea acestora sunt cuprinse în Tabelul XV.19. Este de subliniat faptul că asemenea principii nutritive se află într-o strânsă inter-relaţie. Aceasta este total corespunzătoare inter-relaţiei metabolismelor desfăşurate continuu în organism. Aşa cum funcţionarea defectuoasă a unei enzime participante sau absenţa unei singure reacţii biochimice tulbură întregul metabolism din care face parte şi antrenează disfuncţii în metabolismele conexe, tot astfel absenţa unuia sau mai multor principii nutritive din raţie poate determina tulburări funcţionale sau chiar maladii de origine nutriţională.

Tulburări funcţionale (sau unele maladii) pot fi provocate şi de excesul principiilor nutritive. Astfel, aşa cum s-a mai menţionat, raţiile cu conţinut lipidic ridicat favorizează ateroscleroza şi bolile cardiace coronariene. De asemenea, ingerările sistematice - timp mai îndelungat - de raţii bogate în lipide predispun la cancer de colon, de sân şi de prostată. Pe de altă parte, regimul alimentar foarte sărat determină hipertensiune şi accidente vasculare cerebrale. Prin urmare, şi excesul alimentar este nociv. De aceea, compoziţia raţiei alimentare, trebuie să fie riguros controlată şi ajustată astfel încât să se poată înlătura – cât mai repede posibil – cele două situaţii extreme: subalimentaţia şi supra-alimentaţia. Într-adevăr, în cazul aportului insuficient de substanţe nutritive este necesar să se administreze suplimentele alimentare corespunzătoare cerinţelor. Pe de altă parte, excesul nutritiv trebuie combătut prin reducerea cantitativă şi calitativă a substanţelor alimentare, până la atingerea strictului necesar stării de întreţinere. În vederea realizării unor asemenea deziderate şi pentru a se putea păstra în permanenţă echilibrul alimentar este nevoie să se coreleze aporturile principalelor categorii de principii nutritive ale raţiei cu cheltuiala energetică depusă. Studiile statistice efectuate în această problemă au dus la concluzia că cele mai corespunzătoare proporţii ale principalelor categorii de principii nutritive, necesare acoperii nevoilor energetice, sunt cele din Tabelul XV.20.

Tabelul XV.20

Aporturile principalelor categorii de principii nutritive ale raţiei, exprimate în procente din cheltuiala energetică

Principiul nutritiv	*% din cheltuiala energetică totală*	
Glucide totale	58	
zaharuri complexe şi din surse naturale		48
zahăr rafinat		10
Lipide totale	30	
saturate		10
nesaturate		10
polinesaturate		10
Colesterol (mg/zi)		300
Sare (g/zi)		5

Ţinând seama de cifrele consemnate în Tabelul XV.20 şi de avantajele sau neajunsurile consumului anumitor alimente, se pot formula câteva consideraţii utile. Astfel, pentru asigurarea sănătăţii şi înlăturarea riscurilor întâlnite (hiperlipemie, diabet, hipertensiune, ateroscleroză, obezitate) este necesar ca în alimentaţia normală să se urmărească reducerea consumului de glucide (în special, concentrate), de lipide (grăsimi saturate, colesterol) şi de sare. Este preferabil ca înlocuirea parţială a grăsimilor saturate din raţie să se realizeze prin uleiuri cuprinzând acizi graşi nesaturaţi; inclusiv, cei esenţiali.

Pe de altă parte, este recomandabilă creşterea consumului de legume şi fructe asigurându-se astfel aportul constant şi suficient de vitamine, minerale şi fibre alimentare. Un alt fapt deosebit de important este ca administrarea raţiilor complete să fie regulată, la intervale bine stabilite şi respectate. În caz contrar, pierderile energetice nu mai pot fi acoperite de aporturile alimentare. În asemenea condiţii, organismul consumă din propriile rezerve energetice (glicogen, lipide de depozit). Situaţia aceasta nefavorabilă este întâlnită şi la începutul perioadelor de nealimentaţie. Ulterior, dacă lipsa de alimentaţie se prelungeşte rezervele energetice proprii se epuizează şi se ajunge chiar la utilizarea proteinelor constituente. Consumul proteinelor proprii este evidenţiat printr-un intens bilanţ azotat negativ, ceea ce reprezintă o situaţie foarte gravă pentru organism şi care trebuie evitată cu desăvârşire.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ţinînd seama de [illegible] consumului unor alimente, se pot formula câteva recomandări utile. Astfel, pentru menţinerea sănătăţii şi înlăturarea riscurilor (hiperlipemie, diabet, hipertensiune, ateroscleroză, obezitate) este necesar ca în alimentaţia normală să se urmărească reducerea consumului de glucide (în special concentrate), de lipide (grăsimi saturate, colesterol) şi de sare. [illegible]

[illegible] aterosclerozei şi bolile cardiace coronariene. De asemenea [illegible] mai îndelungat – de viaţă bogate în lipide predispun la cancer de colon, de sân şi de prostată. Pe de altă parte, regimul alimentar bogat în sare determină hipertensiune şi accidente vasculare cerebrale. Prin urmare, şi excesul alimentar este nociv. De aceea, compoziţia raţiei alimentare trebuie să fie riguros controlată şi ajustată astfel încât să se poată înlătura – cât mai repede posibil – cele două situaţii extreme: subalimentaţia şi supra-alimentaţia. Într-adevăr, în cazul aportului insuficient de substanţe nutritive este necesar să se administreze suplimentele alimentare corespunzătoare carenţelor. Pe de altă parte, excesul nutritiv trebuie combătut prin reducerea cantitativă şi calitativă a substanţelor alimentare, până la atingerea [illegible]. În vederea realizării unor [illegible] şi pentru a se putea păstra în permanenţă echilibrul alimentar este nevoie să se coreleze aportul principalelor categorii de principii nutritive cu cheltuiala energetică depusă. Studiile [illegible] efectuate în această problemă au dus la concluzia că cele mai corespunzătoare proporţii ale principalelor categorii de principii nutritive, necesare acoperirii nevoilor energetice, sunt cele din Tabelul XV.20.

Tabelul XV.20

Aportul principalelor categorii de principii nutritive ale căror proporţii în procente din cheltuiala energetică

Principii nutritive		% din cheltuiala energetică totală	
Glucide totale		58	
	zaharuri complexe şi alte glucide naturale		48
	zahăr rafinat		10
Lipide totale		30	
	saturate		10
	mononesaturate		10
	polinesaturate		10
Colesterol (mg/zi)			300
Sare (g/zi)			5

GLOSAR

Acetal. Produsul condensării unei aldehide cu două molecule de alcool.

Acetil-CoA. Tiolesterul coenzimei A cu acidul acetic. Metabolit implicat în transformările metabolice ale glucidelor, lipidelor şi aminoacizilor.

Actină. Proteină musculară asociată cu miozina sub formă de actomiozină. Deasemenea, sub formă de filamente este componentul principal al citoscheletului celulelor eucariote.

Actinomicină D. Antibiotic care prin legare la ADN inhibă elongarea lanţurilor de ARN.

Adenilat ciclază. Enzimă, catalizează formarea AMP ciclic din ATP.

Adipocit. Celulă specializată pentru a depozita lipide (triacilgliceroli).

ADN. Acid dezoxiribonucleic. Polinucleotid care înmagazinează informaţia genetică pentru toate tipurile de celule şi pentru unii viruşi.

ADN_C. ADN complementar, segment de ADN obţinut în vitro cu ajutorul transcriptazei inverse şi a unui ARN mesager.

ADN himeric. ADN recombinant ale cărei părţi provin din două sau mai multe surse.

ADN ligază. O enzimă care catalizează legarea (prin legătură 3',5'- fosfodiesterică) a două fragmente de ADN.

ADN polimerază. Enzimă care catalizează formarea lanţurilor de ADN din dezoxiribonucleotide trifosforilate.

ADN recombinant. Un ADN modificat care este format prin inserţia unei secvenţe de dezoxiribonucleotide care nu erau prezente anterior în ADN.

Aerob. Un organism care necesită aerul (dioxigenul) pentru existenţa sa.

Alele. Forme alternative ale unei gene.

Alosteric. O enzimă (proteină) cu mai multe centre de legare a unor liganzi. Ocuparea unui centru alterează afinitatea celuilalt sau celorlalte centre pentru liganzii specifici.

Amfipatic (amfifil). Compus care prezintă o regiune hidrofilă şi una hidrofobă.

AMP ciclic (3',5'-adenozin monofosfat). Moleculă cu roluri reglatoare. Este mesagerul secund al multor hormoni.

Anabolism. Acea parte a metabolismului care cuprinde reacţiile de biosinteză a constituenţilor organismului.

Anaerob. Organism care poate trăi în absenţa aerului.

Angstrom (A). Unitate de lungime egală cu 10^{-8} cm (0,1 nm).

Anomeri. Stereoizomeri ai formelor ciclice ale monozaharidelor care diferă prin configuraţiile atomului de carbon carbonilic semiacetalizat.

Anticodon. Secvenţă de trei nucleotide din ARN de transfer care corespunde unui codon din ARN mesager.

Anticorp. Proteină (imunoglobulină) care interacţionează în mod specific cu o substanţă macromoleculară străină (antigen).

Antigen. Substanţă macromoleculară străină care pătrunsă într-un organism, declanşează sinteză de anticorpi.

Antiparalel. Două catene de ADN sunt antiparalele când una dintre ele evoluează 3' → 5' şi cealaltă în sens invers (5'→ 3'). Două lanţuri polipeptidice sunt antiparalele când un lanţ evoluează în sensul capăt N-terminal → capăt C-terminal şi celălalt în sens opus.

ARN. Acid ribonucleic. Poliribonucleotid cu roluri în transferul informaţiei genetice de la ADN la proteine.

ARN mesager (ARN_m). Specie de ARN, monocatenar, cuprinzând succesiunea codonilor care specifică secvenţa aminoacizilor dintr-o proteină.

ARN polimerază. Enzimă care catalizează formarea lanţurilor de poliribunucleotide.

ARN ribozomial (ARN_r). Specii de ARN asociate cu proteine şi care alcătuiesc ribozomii.

ARN de transfer (ARN_t). Specii de ARN cu rol de activare a aminacizilor şi de transport al acestora la locul sintezei proteice (ribozomii).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Autocataliză. Proces de cataliză în care catalizatorul este un produs al reacţiei pe care o catalizează.

Autoradiografie. Tehnică de detectare a unei molecule radioactive prin vizualizarea sa prin efectele produse pe o placă fotografică.

Autotrof. Un organism care îşi construieşte constituenţii proprii din CO_2 şi H_2O. Plantele sunt autotrofe (se hrănesc singure).

B, celule. Celule ale sistemului imun. Prin diferenţiere formează celule care sintetizează imunoglobuline.

B, formă. Formă a ADN dublu catenar, cuprinde 10,5 baze per tură,

Bibliotecă genică. Colecţie de fragmente clonate care reprezintă întreg genomul unui organism. Bibliotecile genice pot fi alcătuite din ADN genomic sau din ADN_C.

Bioluminescenţă. Producere de lumină de către un sistem biochimic.

Bistrat lipidic. Un strat dublu de lipide amfipatice cu capetele hidrofile orientate spre mediul apos şi cu regiunile hidrofobe orientate spre interior.

Carbon asimetric. Atom de carbon legat la patru grupări diferite.

Carcinogen. Un compus chimic care poate produce cancer.

Carotenoid. Compus poliizoprenic, cu un grad înalt de nesaturare, liposolubil.

Catabolism. Acea parte a metabolismului care cuprinde reacţiile de degadare a constituenţilor organismului.

Catalizator. Compus care accelerează o reacţie chimică prin scăderea energiei de activare. La sfârşitul transformării catalizatorul este nemodificat.

Centru activ. Regiune a unei molecule enzimatice care leagă substratul şi determină transformarea sa în produs (produşi).

Cetogenic. Despre unii aminoacizi care în cursul metabolizării lor conduc la acetoacetat (corp cetonic) sau acetil-CoA (potenţial cetogenic).

Cetoză. O stare a organismului caracterizată prin producţie masivă de corpi cetonici, cu hipercetonemie şi cetonurie.

Chelat. Complex de coordinaţie între molecule care au mai multe centre de legare.

Chiralic, compus. Un compus cu asimetrie moleculară, prezintă două configuraţii nesuperpozabile.

Chiralitate. Proprietatea unei molecule sau obiect de a nu se suprapune imaginii sale în oglindă.

Ciclu celular. Toate stadiile prin care trece o celulă de la o generaţie celulară la alta. Un ciclu celular cuprinde fazele G_1, G_2, S şi M.

Cistron. Unitate genetică care codifică un lanţ polipeptidic.

Citocrom. Hemoproteină care funcţionează ca transportor de electroni.

Citoplasmă. Conţinutul celular delimitat de membrana plasmică, excluzând nucleul.

Citoschelet. Structuri filamentoase din citoplasma celulelor eucariote.

Citosol. Porţiunea lichidă a citoplasmei.

Clonă. Grup de celule sau molecule identice care derivă dintr-o aceiaşi celulă sau moleculă parentală.

Clorofilă. Pigment fotosintetic de culoare verde care cuprinde un complex porfirinic cu magneziu.

Codon. Secvenţă de trei nucleotide din ARN masager care specifică un aminoacid.

Coenzimă. Substanţă neproteică care se asociază cu proteina enzimatică pentru a forma un catalizator activ.

Cofactor. Compus cu moleculă mică necesar activităţii catalitice a unei enzime. Poate fi un ion sau o coenzimă.

Configuraţie. Aranjamentul tridimensional stabil pe care covalenţele îl impun unei molecule.

Conformaţie. Aranjamentul tridimensional pe care o moleculă îl adoptă prin rotaţii în jurul legăturilor simple.

Constantă Michaelis. Parametru cinetic al unei enzime. Măsoară afinitatea enzimei pentru substrat. Are valoarea concentraţiei de substrat când reacţia enzimatică se desfăşoară cu viteză semimaximă.

Constitutiv. O enzimă sau proteină care este sintetizată cu o viteză relativ constantă, indiferent de condiţiile metabolice sau nutritive ale organismului.

Corpi cetonici. Denumirea colectivă atribuită acetoacetatului, β-hidroxibutiratului şi acetonei, produşi ai catabolismului acizilor graşi. Formarea lor în exces constitue dereglarea metabolică majoră în diabetul zaharat.

Cosmidă. Plasmidă în care secvenţele de ADN din bacteriofagul lambda necesare pentru împachetarea ADN au fost inserate prin tehnologia ADN recombinant.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cromatină. Fibre de nucleoproteine care alcătuiesc cromozomii eucariotelor.

Cromatografie. Procedeu de separare a unor molecule aparţinând aceleiaşi familii pe baza diferenţelor de afinitate dintre acestea şi două faze nemiscibile mobile.

Cromozom. Structuri alcătuite din ADN şi proteine vizibile în nucleul celular în metafază. Majoritatea genelor unui organism se află în cromozomi.

Cuplare chemiosmotică. Sinteza de ATP pe seama unui gradient electrochimic generat de procesele oxidative mitocondriale.

Dalton. Unitate de masă atomică ($1{,}66.10^{-24}$ g.)

Dezaminare (deaminare). Reacţie prin care se îndepărtează dintr-un aminoacid sau alt compus o grupare aminică.

Denaturare. Modificarea conformaţiei native a unei proteine sau acid nucleic.

Dializă. Îndepărtarea moleculelor mici dintr-o soluţie complexă de substanţe macromoleculare cu ajutorul unei membrane semipermeabile.

Diferenţiere. Modificarea caracterelor unei celule, a genelor care sunt exprimate, ca rezultat al creşterii şi replicării.

Diploidă, celulă. Celulă care cuprinde câte doi cromozomi din fiecare tip. Celulele somatice sunt diploide.

Dipol. Structură chimică în care sarcinile pozitive şi cele negative sunt despărţite.

Disulfură. Produsul oxidării (dehidrogenării) unui tioalcool.

Domeniu, structural. O regiune dintr-o moleculă proteică cu structuri secundară şi terţiară proprii şi care prezintă un anumit grad de autonomie funcţională.

Dominant. Alelă al cărei fenotip se exprimă fie că organismul este homozigot, fie heterozigot pentru acea alelă.

Duplex, ADN. ADN cu structură dublu elicoidală.

Echilibru. Starea unui sistem chimic în care viteza transformării în sens direct este egală cu viteza transformării în sens invers.

Ecuaţia Henderson-Hasselbalch. Relaţie care leagă pH-ul unui sistem tampon de valoarea pK a acidului şi de raportul dintre concentraţia sării şi concentraţia acidului.

Ecuaţia Lineweaver-Burk. Inversul ecuaţiei Michaelis-Menten. Are forma ecuaţiei unei drepte.

Ecuaţia Michaelis-Menten. Relaţie care leagă viteza unei reacţii enzimatice de concentraţia substratului. Are forma ecuaţiei unui arc de hiperbolă.

Efector alosteric. Compus care fixându-se într-un centru alosteric alterează proprietăţile proteinei (enzimă).

Eicosanoid. Compus biologic activ derivat din acid arahidonic, acid gras cu 20 atomi de carbon.

Electrofil. Compus sau grupare cu deficit electronic (cu orbitali vacanţi) şi care atacă centre cu electroni neparticipanţi (centre nucleofile).

Electroforeză. Deplasarea unor particule într-un câmp electric. Tehnică pentru analiza amestecurilor de molecule dintr-o soluţie pe baza mobilităţii lor electroforetice.

Eluat. Efluentul dintr-o coloană cromatografică.

Enantiomeri. Izomeri de configuraţie care diferă prin sensul activităţii lor optice.

Endergonic. Proces pentru care modificarea energiei libere are o valoare pozitivă.

Endocrin. Celulă sau glandă care sintetizează şi secretă în sânge un hormon.

Endonuclează. O enzimă care scindează legături fosfodiesterice din acizii nucleici situate în interiorul lanţurilor.

Endopeptidază. O enzimă care scindează legături peptidice situate în interiorul lanţului polipeptidic.

Energie liberă. Funcţie termodinamică care descrie capacitatea unui sistem de a efectua un lucru util (la temperatură, volum şi presiune constante).

Enhancer. O secvenţă de ADN care stimulează transcrierea unei gene. Enhancer-ul este situat fie în aval, fie în amonte de promotorul genei.

Entropie. Funcţie termodinamică care descrie gradul de dezordine a unui sistem.

Epimeri. Stereoizomeri ai monozaharidelor cu mai multe centre asimetrice care diferă însă numai prin configuraţia unuia dintre aceste centre.

Eucariot. Organism sau celulă la care nucleul este delimitat printr-un înveliş de restul citoplasmei.

Eucromatină. Stare a cromatinei mai puţin condensată şi activă transcripţional.

Exergonic. Proces care decurge cu scăderea energiei libere a sistemului.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Exon. Segment al unei gene care este transcris şi apoi exprimat sub formă de proteină.

Exonuclează. O enzimă care scindează legături fosfodiesterice terminale din acizii nucleici.

Exopeptidază. O enzimă care scindează legături peptidice terminale din proteine.

Fenotip. Caracterele morfologice şi funcţionale ale unui organism, expresie a caracterelor genetice.

Fluorescenţă. Emisia de lumină de către o moleculă excitată, acesta din urmă revenind la starea bazală.

Fosfodiester. Compus derivat din acidul fosforic în care două din funcţiile sale acide sunt esterificate cu alcooli. Legătura internucleotidică din acizii nucleici este o legătură 3',5' - fosfodiesterică.

Fosforilare. Ataşarea la o biomoleculă a unui rest fosforil.

Fosforilare oxidativă. Sinteza de ATP cuplată cu procesele oxidative mitocondriale.

Fosforoliză. Scindarea unei legături, a unei molecule de către acidul fosforic.

Furan. Compus heterociclic fundamental cu ciclu pentagonal cuprinzând ca heteroatom un atom de oxigen.

Furanoză. Monozaharid cu structură semiacetalică cuprinzând un ciclu de cinci atomi.

G_1. Faza unui ciclu celular cuprinsă între o mitoză şi faza S.

G_2. Perioada unui ciclu celular cuprinsă între faza S şi următoarea mitoză.

ΔG. Diferenţa dintre energia liberă a rezultanţilor şi energia liberă a reactanţilor (energie liberă de reacţie).

Genă. Porţiune a genomului care codifică o proteină.

Genom. Conţinutul genetic total al unei celule sau virus.

Genotip. Ansamblul caracterelor ereditare ale unui organism determinate de alcătuirea genomului său.

Glicozid. Derivat de tip acetalic al formelor semiacetalice ale monozaharidelor.

Gradient. Direcţia după care are loc variaţia (crescătoare sau descrescătoare) a unui parametru fizic, chimic sau biochimic.

Haploidă, celulă. Celulă care cuprinde numai câte un cromozom din fiecare tip.

Hem. Complex al protoporfirinei cu fierul. Gruparea prostetică a hemoproteinelor.

Heterocromatină. O stare condensată a cromatinei şi cu o activitate transcripţională redusă.

Heteropolimer. Un polimer cuprinzând două sau mai multe tipuri de unităţi monomerice.

Heterotrof. Un organism care se hrăneşte cu compuşi organici complexi, sintetizaţi de alte organisme.

Heterozigot. Un organism care posedă două alele diferite ale aceleiaşi gene.

Hidrofil. Un compus sau grupare chimică cu afinitate pentru apă.

Hidrofob. Un compus sau grupare chimică cu caracter nepolar (nu are afinitate pentru apă).

Hidroliză. Scinderea unei legături, a unei molecule, de către apă.

Homeostazie. Menţinere la un anumit nivel a parametrilor fizicochimici, funcţionali ai unui organism.

Homopolimer. Un polimer alcătuit dintr-un singur tip de unităţi monomerice.

Homozigot. Un organism care posedă două alele identice ale unei aceleiaşi gene.

Inductor. Un compus care adăugat la un mediu de cultură sau introdus într-un organism determină accelerarea sintezei unei proteine.

Inhibitor enzimatic. Un compus care combinându-se cu o enzimă îi micşorează activitatea catalitică.

Intron. Segment al unei gene care este transcris dar care este îndepărtat înainte de traducere (nu se exprimă ca lanţ polipeptidic).

In vitro. În legătură cu ceia ce se petrece în afara organismului (în eprubetă), în opoziţie cu in vivo.

Izoenzime. Forme multiple ale aceleiaşi enzime. Au aceiaşi activitate catalitică dar se diferenţiază prin una sau mai multe însuşiri.

Izomeri. Compuşi care au aceiaşi constituţie dar diferă prin una sau mai multe însuşiri.

Kinază. O enzimă care catalizează fosforilarea unei molecule acceptor. În genere donorul de grup fosforil este ATP.

Liază. O enzimă care catalizează o reacţie de eliminare cu formarea unei legături duble, sau inversul acesteia.

Ligand. Denumire generică care descrie orice compus capabil de a se lega la o macromoleculă (proteină, ADN).

Ligază. O enzimă care catalizează o reacţie de condensare endergonică, susţinută energetic prin hidroliza ATP (sau a altui compus macroergic).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lisozom. Organit celular bogat în enzime hidrolitice.

M. Perioada unui ciclu celular când are loc mitoza.

Macroergic. Un compus sau o legătură covalentă a cărui hidroliză decurge cu o cădere mare de energie liberă.

Meioză. Proces prin care celule diploide suferă o diviziune formând celule sexuale haploide.

Mesager. O moleculă care transportă un mesaj, o informaţie, de la o celulă la altă celulă.

Mesager secund. Moleculă mică care se formează intracelular ca răspuns la un mesager extracelular (hormon) şi care exercită roluri reglatoare.

Metabolism. Totalitatea transformărilor biochimice care au loc într-un organism.

Metafază. Stadiul mitozei sau meiozei când toţi cromozomii sunt alineaţi de o parte şi alta a ecuatorului.

Micelie. Agregat de molecule lipidice polare în care grupările hidrofobe sunt orientate spre interior şi cele hidrofile spre mediul apos.

Mitocondrie. Organit celular care cuprinde majoritatea sistemelor enzimatice necesare oxidărilor celulare (ciclu acizilor tricarboxilici, beta-oxidare, lanţ respirator).

Mitoză. Fază a diviziunii celulare, cromozomii replicaţi s-au segregat şi urmează diviziunea.

Mutaţie. O alterare permanentă a unei gene sau a unui grup de gene.

Mutant. Genă sau organism care posedă o alterare a genomului (o mutaţie).

Mutarotaţie. Modificarea activităţii optice a unui monozaharid imediat după dizolvarea sa până se stabileşte echilibrul între anomerii α şi β ai formelor furanozice şi piranozice.

Northern blot. Tehnică de a transfera un ARN dintr-un gel de agaroză pe un filtru de nitroceluloză pe care ARN va fi apoi detectat cu o probă potrivită.

Nuclează. O enzimă care desface hidrolitic legăturile internucleotidice din acizii nucleici.

Nucleofil. Un compus sau grupare care posedă perechi de electroni neparticipanţi şi poate ataca centre cu deficit electronic (electrofile).

Nucleol. Structură sferică vizibilă în nucleu în cursul interfazei. În nucleol are loc sinteza de ARN ribozomial.

Nucleozom. Particulă alcătuită dintr-un fragment de ADN care înveleşte un agregat de histone. Nucleozomii sunt legaţi între ei prin segmente de ADN nenucleozomal.

Oncogenă. Genă de origine celulară sau virală care inserându-se în genomul unei celule animale determină creşterea aberantă a acesteia.

Oxidare. Pierderea de electroni (sau de hidrogen) de către un compus.

β - Oxidare. Secvenţă metabolică de oxidare a acizilor graşi prin detaşarea succesivă de acetil-CoA.

Palindrom. Secvenţă de ADN dublu elicoidal care este aceaşi când cele două catene sunt citite din direcţii opuse.

Permează. O proteină care catalizează transportul unei anume molecule de pe o parte a unei membrane pe cealaltă parte.

Peroxizomi. Organite celulare care cuprind diverse oxidaze, enzime care reduc dioxogenul la peroxid de hidrogen.

Piran. Compus heterociclic fundamental cu ciclu hexagonal cuprinzând ca heteroatom oxigenul.

Piranoză. Forma semiacetalică a unui monozaharid cuprinzând un ciclu de şase atomi.

Plasmidă. Moleculă mică de ADN, extracromozomială, circulară şi care se replică independent de ADN gazdă.

Polimorfism molecular. Calitatea unei proteine cu o anumită funcţie de a exista în forme multiple specificate genetic.

Polizom (poliribozom). Complex format prin asocierea unei molecule de ARN mesager cu mai mulţi ribozomi care sintetizează fiecare câte un exemplar din proteina specificată de ARNm.

Potenţial redox (E). Tendinţa unui cuplu redox de a ceda sau de a primi electroni.

Preproproteină. Precursor inactiv al unei proteine secretorii. După îndepărtarea peptidului pre (peptid semnal) se transformă într-o proproteină.

Procariot. Un organism sau celulă care nu are nucleu sau alte organite subcelulare.

Prochiralică, moleculă. Moleculă care printr-o singură substituţie devine asimetrică (capătă un centru chiralic).

Protomeri. Lanţurile polipeptidice individuale care alcătuiesc o proteină oligomerică.

Prostetică, grupare. Compus neproteic care împreună cu o proteină formează o moleculă funcţională.

Pseudogenă. Un segment de ADN inactiv care rezultă prin mutaţii ale unei gene parentale active.

Punte disulfurică. Legătură -S-S- între două segmente polipeptidice realizată prin oxidarea a două resturi de cisteină.

Puromicină. Antibiotic care inhibă sinteza proteică prin competiţia dintre puromicină şi un aminoacil-ARN_t pentru situsul aminoacil de pe ribozomi.

Receptor hormonal. Proteină celulară care posedă un situs de recunoaştere şi de legare a unui hormon cu care formează complexul hormon-receptor.

Reducere. Câştigul de electroni (sau de hidrogen) de către un compus.

Renaturare. Revenirea unei macromolecule (proteină, ADN) la conformaţia nativă anterioară denaturării.

Replicare. Sinteza a două molecule dublu elicoidale de ADN, identice între ele şi identice cu molecula parentală.

Represie enzimatică. Reducerea vitezei de sinteză a unei enzime în prezenţa unui represor.

Represor. Proteină reglatoare care inhibă transcrierea uneia sau mai multor gene.

S. Unitate Svedberg. Constantă de sedimentare, $1S=10^{-13}s$. Măsoară viteza de sedimentare a unei molecule într-un câmp centrifugal.

S, faza. Perioadă din ciclul celular situată între fazele G_1 şi G_2 când are loc sinteza de ADN.

Salifiere (salting out). Precipitarea unei proteine din soluţie prin adăugarea unor cantităţi mari de sare (ca sulfat de amoniu).

Semiacetal. Produsul condensării unei aldehide cu o moleculă de alcool.

Sintază. O enzimă care catalizează o reacţie sintetică fără participarea ATP sau a altui compus macroergic. Sintazele sunt liaze.

Sintetază. O enzimă care catalizează o reacţie sintetică cu participarea ATP sau a altui compus macroergic. Sintetazele sunt ligaze.

Southern blot. Tehnică de a transfera ADN de pe un gel de agaroză pe un filtru de nitroceluloză pe care ADN este apoi detectat cu ADN sau cu ARN complementar. Tehnică introdusă de E. Southern.

Stare staţionară. Stare a unui sistem deschis când intrările şi ieşirile sunt echivalente, compoziţia sistemului rămânând relativ constantă.

Stereoizomeri. Izomeri sterici, diferă prin configuraţiile moleculelor.

T, celule. Tip de celule ale sistemului imun.

Tampon. Soluţie care tinde să-şi păstreze pH-ul propriu la adăugare de acid sau de bază. O soluţie tampon cuprinde cantităţi relativ mari dintr-un acid şi baza sa conjugată.

Tioalcool. Compus care cuprinde funcţia - SH.

Tioeter. Compus cu formula R-S-R.

Tiosemiacetal. Compus obţinut prin condensarea unei molecule de aldehidă cu un tioalcool.

Traducere. Etapă a exprimării informaţiei genetice corespunzând sintezei unui lanţ polipeptidic pe baza informaţiei înscrise în ARN mesager.

Transcriere. Etapă a exprimării informaţiei genetice corespunzând sintezei de ARN utilizându-se o catenă tipar de ADN.

Transcriptază inversă (revers transcriptază). Enzimă care catalizează sinteza unui ADN utilizând o catenă tipar de ARN.

Transport activ. Transportul transmembranar al unei molecule cu consum de energie chimică.

Transport facilitat. Transportul transmembranar al unei molecule cu ajutorul unei proteine transportoare.

Vector. Plasmidă sau virus în care se introduce un ADN cu scopul multiplicării acestuia.

Z, formă. Formă a ADN dublucatenar cu o elice stângă (forma B este o elice dreaptă).

Western blot. Tehnică de transfer a unei proteine pe un filtru de nitroceluloză pe care apoi proteina este analizată.

Zimogen. Precursorul inactiv al unei enzime (proenzimă).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

UNELE PRESCURTĂRI UTILIZATE CURENT ÎN BIOCHIMIE

A adenină
A alanină
Ach acetilcolină
ACTH corticotropină, hormon adrenocorticotrop
ADN(DNA) acid dezoxiribonucleic
ADP adenozin difosfat
Ala alanină
ALA delta-aminolevulinat
AMP adenozin monofosfat
AMP_C adenozin monofosfat ciclic, 3'5'-adenozin monofosfat
Arg arginină
ARN(RNA) acid ribonucleic
ARN_m acid ribonucleic mesager
ARN_r acid ribonucleic ribozomial
ARN_t acid ribonucleic de transfer
Asn asparagină
Asp acid aspartic
Asx acid aspartic sau asparagină
ATP adenozin trifosfat
B acid aspartic sau asparagină
bp perechi de baze
BPG 2,3 - bisfosfoglicerat
C cisteină
C citozină
CDP citidin difosfat
CMP citidin monofosfat
CoA sau CoASH coenzima A
CoQ coenzima Q, ubichinona (forma oxidată)
$CoQH_2$ coenzima Q (forma redusă)
CTP citidin trifosfat
D acid aspartic
D dalton
d dezoxi (deoxi)
DEAE dietilaminoetil
DG sau DAG diacilglicerol
DHAP dihidroxiacetonofosfat
DOPA dihidroxifenilalanină
E acid glutamic
EF factor de elongare
EGF factorul de creştere a epidermei
F fenilalanină
FAD flavin adenin dinucleotid (forma oxidată)
$FADH_2$ flavin adenin dinucleotid (forma redusă)
FMN flavin mononucleotid (forma oxidată)
$FMNH_2$ flavin mononucleotid (forma redusă)
Fru fructoză
G glicină (glicocol)
G guanină
GABA acid γ - aminobutiric
Gal galactoză
GDP guanozin difosfat
Gla acid γ - carboxiglutamic
Gln glutamină
Glu acid glutamic
Glx acid glutamic sau glutamină
Gly glicină (glicocol)
GMP guanozin monofosfat
GMP_c guanozin monofosfat ciclic, 3'5'- guanozin monofosfat
GSH glutation (forma redusă)
GSSG glutation (forma oxidată)
GTP guanozin trifosfat
H histidină
Hb hemoglobină
HDL lipoproteine cu densitate mare
His histidină
HMG-CoA 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
Hyp 4-hidroxi-prolină
I izoleucină
IDL lipoproteine cu densitate intermediară
IF factor de iniţiere
Ig imunoglobulină
Ile izoleucină
IMP inozin monofosfat
IP_3 1,4,5 - inozitoltrisfosfat
ITP inozin trifosfat
L leucină
Leu leucină
LCAT lecitin-colesterol aciltransferază
LDH lactat dehidrogenază

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

LDL lipoproteine cu densitate mică
Lys lizină
M metionină
Man manoză
Mb mioglobină
Met metionină
MHC complex major de histocompatibilitate
N asparagină
NAD^+ nicotinamid adenin dinucleotid (forma oxidată)
NADH nicotinamid adenin dinucleotid (forma redusă)
$NADP^+$ nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (forma oxidată)
NADPH nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (forma redusă)
NANA acid N-acetilneuraminic
NDP nucleozid difosfat
NMP nucleozid monofosfat
NTP nucleozid trifosfat
P prolină
P_i fosfat anorganic
PP_i pirofosfat anorganic
PDGF factorul de creştere derivat din plachete
PEP acid fosfoenolpiruvic
PFK fosfofructokinază
PG prostaglandină
Phe fenilalanină
PKU fenilcetonurie
PLP piridoxal fosfat
PRPP 5-fosforibozil- α - pirofosfat
Q glutamină
Q coenzima Q (forma oxidată)
QH_2 coenzima Q (forma redusă)
R arginină
S serină
S unitate Svedberg
SAM S -adenozil-metionină
SDS dodecilsulfat de sodiu
T timină
T treonină
TCA acid tricarboxilic
Thr treonină
TDP timidin difosfat
TMP timidin monofosfat
TPP tiamin pirofosfat
Trp triptofan
TTP timidin trifosfat
Tyr tirozină
U uracil
UDP uridin difosfat
UMP uridin monofosfat
UTP uridin trifosfat
V valină
V_{max} viteză maximă
Val valină
VLDL lipoproteine cu densitate foarte mică
W triptofan
XMP xantozin monofosfat
Y tirozină
Z acid glutamic sau glutamină

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Adams R.L., Knowler J.T., Leader D.P. - The biochemistry of the nucleic acids, Chapman and Hall, N. Y., 1992.

Akiyama S.K., Nagata K., Yamada K.M. - Cell surface receptors for extracelular matrix components, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, *1031*, 91.

Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. - Molecular biology of the cell (2nd edition) Garland Publishing Inc. N.Y., 1989.

Altman S., Kirsebom L., Talbot S. - Recent studies of ribonuclease P, FASEB J., 1993, *7*, 7.

Antébi Elizabeth, Fishlock D. - Biotechnology - Strategies for Life, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1986.

Arnheim N., Erlich H. - Polymerase chain reaction strategy, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, *61*, 131.

Baggiolini M.M., Clark-Lewis I. - Interleukin -8, a chemotactic and inflammatory cytokine, *FEBS Letters*, 1992, *307*, 97.

Beato M. - Gene regulation by steroid hormones, *Cell*, 1989, *56*, 335.

Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A.M. - Receptor-effector coupling by G proteins, *Biochim. Biophys.Acta*, 1990, *1031*, 163.

Boulanger P., Polonovski J., Biserte G., Dautrevaux M. - Biochimie médicale, 2e edition, Masson, Paris, 1989.

Cech T.R. - RNA as an enzyme, *Sci. Am.*, 1986, *255*, 64.

Cech T.R. - Ribosomes and their medical implications, *J.Am.Med.Assoc.*, 1988, *260*, 3030.

Champe Pamela C., Harvey A.R. - Biochemistry, 2nd edition, F.B. Lippincot Company, Philadelphia, 1994.

Clarke S. - Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, *61*, 355.

Cohen P. - The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity, *Eur. J. Biochem.*, 1985, *151*, 439.

Cristea-Popa Elena, Popescu Aurora, Truţia E., Dinu Veronica. - Tratat de biochimie medicală, Bucureşti, 1991.

Davidson V.L., Sittman D.B. - Biochemistry, 3rd edition, Harwal Publishing, Philadelphia, 1994.

Devlin M.T. - Textbook of Biochemistry with clinical correlations, Wiley and Sons Inc. Publication, N.Y., 1992.

Druker B.J., Mamon H.J., Roberts T.M. - Oncogenes, growth factors and signal transduction, *N. Engl. J.Med.*, 1989, *321*, 1383.

Ecker R.H. - Lipoprotein lipase. *N.Engl.J.Med.* 1989, *320*, 1060.

Eisenstein B.I. - The polymerase chain reaction. A new method using molecular genetics for medical diagnosis, *N.Engl.J.Med.*, 1992, *322*, 178.

Evans R. - The steroid and thyroid hormone receptor super family, *Science*, 1988, *240*, 889.

Farago A., Nishizuka Ya. - Protein kinase C in transmembrane signalling, *FEBS Letters*, 1990, *268*, 350.

Fersht A. - Enzyme Structure and Mechanism, 2nd edition, Freeman, N.Y., 1985.

Furie B., Furie B.C. - Molecular and cellular biology of blood coagulation, *N.Engl.J.Med.*, 1992, *326*, 800.

Fuyuhiko Tamanoi. - Inhibitors of Ras farnesyltransferases, *Trends Biochem. Sci.*, 1993, *18*, 349.

Gibson Q.H. - Hemoproteins, ligands and quanta, *J.Biol.Chem.*, 1989, Minireview Compendium, pg. 20155.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Gordon D.J., Rifkind B.M. - High density lipoprotein - the clinical implications of recent studies, *N.Engl.J.Med.*, 1990, *321*, 1311.

Green M. - Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing, *Annu.Rev.Cell Biol.*, 1991, *7*, 559.

Li J., Guerrier-Tagada, Altman S. - Targeted cleavage of mRNA in vitro by RNAase P from Escherichia Coli, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, *89*, 3185.

Halligan B.D., Edwards K.A., Liu L.F. - Topoisomerases, *J.Biol.Chem.*, 1985, *269*, 2475.

Hardingham T.E., Fosang J.Amanda. - Proteoglycans:many forms and many functions, *FASEB J.*, 1992, *6*, 866.

Jaenisch R. - Transgenic animals, *Science*, 1988, *240*, 1468.

Jacob F., Monod J. - Genetic regulatory mechanisms in protein synthesis, *J.Mol.Biol.*, 1961, *3*, 318.

Khochbin S., Lawrence J. - Antisens nucleic acids, *Embo.J.*, 1989, *8*, 4107.

Kornberg A. - DNA replication, *J.Biol.Chem.*, 1988, *1*, 263.

Krant J. - How do enzymes work?, *Science*, 1988, *242*, 533.

Krebs H. - The history of the tricarboxylic acid cycle, *Perspect.Biol.Med.*, 1970, *14*, 154.

Lewis R.A., Ausren K.F., Soberman R.J. - Leukotrienes and other products of the 5-lipooxygenase pathway, *N.Engl.J.Med.*, 1990, *323*, 645.

Lomako J., Lomako W., Whelan W. - A self glucosylating protein in the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis, *FASEB J.*, 1988, 2, 3097.

Long D.M., Ulbenbeck O.C. - Self cleaving catalytic RNA, *FASEB J.*, 1993, *7*, 25.

Lucas P.C., Granner D.K. - Hormone response domains in gene transcription, *Annu.Rev.Biochem.*, 1992, *61*, 1131.

Maniatis T., Reed R. - The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing, *Nature*, 1982, *325*, 673.

Mărgineanu D.G. - Energetica lumii vii, Ed. Edimpex-Speranţa, Bucureşti, 1992.

Mincu I., Popescu Aurora, Ionescu-Târgovişte C. - Elemente de biochimie şi fiziologie a nutriţiei, Vol.I., Edit. Medicală, Bucureşti, 1985.

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. - Harper's Biochemistry, 23rd edition, Appelton and Lange, 1993.

Noller H. - Ribosomal RNA and translation, *Annu.Rev.Biochem.*, 1991, *60*, 191.

Papa S., Guerrieri F., Lorusso M., Boffoli D. - Mechanism of Proton Translocation by the b-c_1 Complex of Mitochondrial Respiratory Chain; in "Water and ions in biological systems", Edited by Alberte Pullman, V. Vasilescu, L. Packer, Plenum Press, N.Y., 1985.

Paul W.E. (editor) - Fundamental Immunology, Raven Press, N.Y., 1989.

Perutz M.F. - Myoglobin and hemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands, *Trends Biochem.Sci.*, 1989, *14*, 42.

Pilkis S.J., El-Maghrabi M., Claus T.H. - Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu.Rev.Biochem.*, 1988, *57*, 755.

Prond W.K., Yugen E.H., Barry W. - Disorders of Amino Acid Metabolism; in Basic Neurochemistry, eds. Siegel G., Agranoff B., Albers R.W., Molinoff P., Raven Press, N.Y., 1989.

Ptashne M. - Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance, *Nature*, 1986, *322*, 697.

Rabemacker T.W., Parck R.B., Dwek R.A. - Glycobiology, *Annu Rev.Biochem.*, 1988, *57*, 285.

Rasmussen H. - The calcium messenger system (I,II), *N.Engl.J.Med.*, 1986, *314*, 1094, 1164.

Rawn J.D. - Biochemistry, Neil Patterson Publishers, Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina, 1989.

Raz I., Katz A., Spencer M.K. - Epinephrine inhibits insulin mediated glycogenesis but enhances glycolysis in human skeletal muscle, *Am.J.Physiol.*, 1991, *260*, E 430.

Rommens J.M., Iannuzzi M.C. - Identification of the cystic fibrosis gene; chromosome walking and jumping, *Science*, 1989, *245*, 1059.

Rusu V., Baran T., Brănişteanu D.D. - Biomembrane şi patologie, Vol. I, Ed. Medicală, Bucureşti, 1988.

Rusu V., Baran T., Brănişteanu D.D. - Biomembrane şi patologie, Vol.II, Ed. Medicală, Bucureşti, 1991.

Saldanha R., Mohr G., Belfort M., Lambwitz A.M. - Group I and group II introns, FASEB J., 1993, 7, 15.

Sancar A., Sancar G. - DNA repair enzymes, *Annu.Rev.Biochem.*, 1988, *57*, 29.

Sanger F., Nicklen S., Coulson R. - DNA sequencing with chain terminaling inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1977, *74*, 5463.

Scott J.E. - Supramolecular organization of extracelluar matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues, *FASEB J.*, 1992, *6*, 2639.

Scriver C.R. et al. (editors) - The metabolic basis of inherited diseases, McGraw-Hill, 1989.

Sodeman W.A., Sodeman T.M. - Pathologic Physiology, Seventh Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1985.

Southern E. - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J.Mol.Biol.*, 1975, *98*, 503.

Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L. - Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N.Engl.J.Med.*, 1989, *320*, 915.

Stryer L. - Biochemistry, 3rd edition W.H. Freeman and Company, N.Y., 1988.

Thomas D.J. - Concepts in protein folding, *FEBS Letters*, 1992, *307*, 10.

Turner P. - Controlling roles for snurps, *Nature*, 1985, *316*, 105.

Utermann G. - The mysteries of lipoprotein (a), *Sci.Am.*, 1989, *246*, 904.

Van Schaftingen E. - A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose - 6 - phosphate and fructose - 1 - phosphate, *Eur.J.Biochem.*, 1989, *179*, 179.

Voet D., Voet Judith G. - Biochemistry, John Wiley and Sons Inc., N.Y., 1990.

Walsh M.P. - Calcium - dependent mechanism of regulating of smooth muscle contraction, *Biochem.Cell.Biol.*, 1991, *69*, 771.

Watson J.D., Crick F.H.C. - Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 1953, *171*, 737.

Weil J.H. - Biochimie générale, Ed. Masson, Paris, 1989.

Weinberg R.A. - The molecules of life, *Sci.Am.*, 1985, *253*, 48.

Weintraub H. - Antisens RNA and DNA, *Sci.Am.*, 1990, *262*, 40.

Wikström M. - Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton pumping, *Nature*, 1989, *338*, 776.

Willison J.D., Foster D.W. - Textbook of Endocrinology, W.B. Saunders Company, N.Y., 1992.

Yardin Y., Ulhrich A. - Growth factor receptor tyrosine kinases, *Annu.Rev.Biochem.*, 1988, *57*, 443.

Young R.A. - RNA polymerase II, *Annu.Rev.Biochem.*, 1991, *60*, 689.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Gordon D.J., Rifkind B.M. - High density lipoprotein - the clinical implications of recent studies, [illegible]
Green M. - Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing, [illegible]
Li J., Guerrier-Takada, Altman S. - Targeted cleavage of mRNA in vitro by RNase P from Escherichia coli, [illegible]
[illegible]
Hardingham T.E., Fosang J.Amanda - Proteoglycans: many forms and many functions, [illegible]
Jaenisch R. - Transgenic animals, Science, 1988, 240, [illegible]
[illegible]
Kornberg A. - DNA replication, J.Biol.Chem., 1988, [illegible]
[illegible]
Krebs H. - The history of the tricarboxylic acid cycle, [illegible]
[illegible]
Lomako J., Lomako W., Whelan W. - A self glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis, [illegible]
Long D.M., Uhlenbeck O.C. - [illegible]
Lucas P.C., Granner D.K. - [illegible]
[illegible]
Margineanu D.G. - Energetica lumii vii, Ed. [illegible], București, [illegible]
Mânzu I., Popescu [illegible]
Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. - Harper's Biochemistry, [illegible], Appleton & Lange, [illegible]
Noller H. - Ribosomal RNA and translation, [illegible]
Papa S., Guerrieri F., Lorusso M. [illegible] Complex of Mitochondrial [illegible]
Paul W.E. (editor) - Fundamental Immunology, Raven Press, New York, [illegible]
Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Claus T.H. - Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, Annu.Rev.Biochem., 1988, 57, 755.
Prensky W.K., Yugen [illegible], Barry W. - Disorders of Amino Acid Metabolism, in Basic Neurochemistry, ed. Siegel G., Agranoff B., Albers R.W., Molinoff P., Raven Press, N.Y., 1989.
Ptashne M. - Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance, Nature, 1986, 322, 697.
Rademacher T.W., Parekh R.B., Dwek R.A. - Glycobiology, Annu.Rev.Biochem., 1988, 57, 785.
Rasmussen H. - The calcium messenger system (I,II), N.Engl.J.Med., 1986, 314, 1094, 1164.
Rawn J.D. - Biochemistry, Neil Patterson Publishers, Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina, 1989.
Raz I., Katz A., Spencer M.K. - Epinephrine inhibits insulin mediated glycogenesis but enhances glycolysis in human skeletal muscle, Am.J.Physiol., 1991, 260, E 430.
Rommens J.M., Iannuzzi M.C. - Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, Science, 1989, 245, 1059.
Roșu V., Baron T., Brânișteanu D.D. - Biomembrane și patologie, Vol. I, Ed. Medicală, București, 1988.

INDEX

A

Abetalipoproteinemie familială 470, 471
ABG (androgen binding globulin) 621
Ac v. anticorp
ACAT v. acilCoA-colesterol aciltransferază
Acceptor de protoni 664
Acetaldehidă activă 330
Acetalfosfatid v. plasmalogene
Acetat tiokinază 496
Acetil-CoA 116, 123, 327, 331, 333, 339, 419, 420, 450
Acetil-CoA carboxilază v. acetil-CoA carboxiligază
Acetil-CoA carboxiligază 123*, 429
Acetil-coenzima A v. acetilCoA
Acetilcolină 370
Acetilcolin esterază 110
N-Acetil-galactozamină 303, 382, 391
N-Acetil-galactozidază 701
N-Acetil-glucozamină 74, 382
Acetilglutamat 491
Acetil glutamat sintetază 491
Acetilhexozaminidază 697, 701
N-Acetil-5-metoxi-serotonină v. melatonină
Acetoacetat 424, 425, 499, 500, 502
Acetoacetil-CoA 424, 425, 500, 502
Acetonă 424
Acid acetil-lipoic 331
Acid N-acetil-neuraminic 304, 684*
Acid acetoacetic vezi acetoacetat
Acid N-acil-neuraminic v. acid sialic
Acid aconitic v. aconitat
Acid adenilic v. AMP
Acid adenilosuccinic v.adenilosuccinat
Acid adenozin difosforic v. ADP
Acid adenozin monofosforic v. AMP
Acid 3',5'-adenozin monofosforic v. AMP_c
Acid adenozin trifosforic v. ATP
Acid aldonic 305
Acid alduronic 305
Acid aminoacetic v. glicină
Acid α-amino-γ-amidoglutaric v. glutamină
Acid α-amino-β-amidosuccinic v. asparagină
Acid α-amino-δ-amidinovalerianic v. citrulină
Acid p-aminobenzoic 18*, 94, 126
Acid α-aminobutiric v. aminobutirat
Acid γ-aminobutiric 18*, 26
Acid α-amino-β-cetoadipic 521
Acid α-amino-β-fenil-propionic v. fenilalanină
Acid α-amino-glutaric v. glutamic
Acid α-amino-δ-guanidin-valerianic v. arginină
Acid α-amino-β-hidroxibutiric v. treonină
Acid α-amino-γ-hidroxibutiric v. homoserină
Acid α-amino-β-hidroxipropionic v. serină
Acid α-amino-β-imidazolil-propionic v. histidină
Acid α-amino-β-indolil-propionic v. triptofan
Acid β-amino-izobutiric v. β-aminoizobutirat
Acid α-amino-izocaproic v. leucină
Acid α-amino-izovalerianic v. valină
Acid δ-amino-levulinic 18*, 521, 522, 525, 527
Acid α-amino-S-metiltiobutiric v. metionină
Acid α-amino-β-metil-valerianic v. izoleucină
Acid α-amino-propionic v. alanină
Acid β-amino-propionic v. β-alanină
Acid α- amino-succinic v. acid aspartic
Acid α-amino-β-tio-butiric v. homocisteină
Acid α-amino-β-tio-propionic v. cisteină
Acid arahic 395*
Acid arahidonic 395*, 396, 434, 472, 474, 475, 710
Acid arginino succinic vezi argininosuccinat
Acid ascorbic 128, 129*, 293, 353, 354, 503, 673
Acid aspartic 17*, 20, 22*
Acid azotos 219
Acid behenic 395*
Acid benzoic 518
Acid 1,2-bisfosfogliceric v. 1,2-bisfosfoglicerat
Acid 1,3-bisfosfogliceric v. 1,3-bisfosfoglicerat
Acid 2,3-bisfosfogliceric v. 2,3-bisfosfoglicerat
Acid butiric 395*
Acid capric 395*
Acid caprilic 395*
Acid caproic 395*
Acid carbamil-fosforic v. carbamil-fosfat
Acid carbamil-aspartic v. carbamil aspartat
Acid γ-carboxiglutamic 59, 138*
Acid cerebronic 395*
Acid α-cetoglutaric v. α-cetoglutarat
Acid 3-ceto-L-gulonic v. 3-ceto-L-gulonat
Acid chenodezoxicolic 413, 456, 457
Acid cisteic 28
Acid citidilic v. CMP
Acid citidin monofosforic v. CMP
Acid citidin difosforic v. CDP

Acid citidin trifosforic v. CTP
Acid citric v. citrat
Acid colanic 413
Acid colic 413
Acid condroitin sulfuric v. condroitin sulfat
Acid conjugat 662
Acid dehidroascorbic v. dehidroascorbat
Acid dezoxicolic 413, 456, 457
Acid α,ε-diamino-caproic v. lizină
Acid α,δ-diamino-valerianic v. ornitină
Acid diazobenzensulfonic
Acid difosfogliceric v. acid bisfosfogliceric
Acid dihidrofolic v. dihidrofolat
Acid dihidroorotic v. dihidroorotat
Acid 3,7- dihidroxi-colanic v. acid chenodezoxicolic
Acid 3,12-dihidroxi-colanic v. acid dezoxicolic
Acid 6,8-ditiooctanoic v. acid lipoic
Acid eicosatetraenoic v. acid arahidonic
Acid elaidic 395, 396
Acid enolpiruvic v. enolpiruvat
Acid fenilacetic v. fenilacetat
Acid fenillactic v. fenillactat
Acid fenilpiruvic v. fenilpiruvat
Acid fitic 721
Acid folic v. folat
Acid formiminoglutamic 497, 499
Acid fosfatidic 399, 400, 441
Acid fosfoenolpiruvic v. fosfoenolpiruvat
Acid 2 fosfogliceric v. 2-fosfoglicerat
Acid 3 fosfogliceric v. 3-fosfoglicerat
Acid 6-fosfogluconic v. 6-fosfogluconat
Acid fumaric v. fumarat
Acid glicocolic v. glicocolat
Acid glicochenodezoxicolic 456
Acid gluconic 305
Acid glucuronic 351, 353, 354, 388, 390, 391, 532, 533, 684
Acid glutamic 17*, 20, 22*
Acid gras polinesaturat 292
Acid gras sintaza 77, 427, 430-432
Acid guanilic v. GMP
Acid guanozin difosforic v. GDP
Acid guanozin monofosforic v. GMP
Acid 3',5'-guanozin monofosforic v.GMP_c
Acid guanozin trifosforic v. GTP
Acid L-gulonic v. L-gulonat
Acid hialuronic v. hialuronat
Acid β-hidroxibutiric v. β-hidroxibutirat
Acid 3-hidroxi-colanic v. acid litocolic
Acid p-hidroxi-fenilpiruvic v. p-hidroxi-fenilpiruvat
Acid hidroxinervonic 395*
Acid hipocloros 285, 291
Acid hipuric 518
Acid homogentizic v. homogentizat
Acid L-iduronic v. L-iduronat
Acid inozinic v. IMP
Acid inozinmonofosforic v. IMP
Acid izocitric v. izocitrat
Acid izovalerianic 507
Acid lactic v. lactat
Acid lauric 395*
Acid lignoceric 395*
Acid linoleic 395*, 710
Acid linolenic 395*, 710
Acid γ-linolenic 395
Acid lipoic 116, 278, 330
Acid lisergic 514
Acid litocolic 413, 456, 457
Acid maleilacetoacetic v. maleilacetoacetat
Acid malic v. malat
Acid malonic v. malonat
Acid N-metilguanidinacetic 517
Acid metilmalonic 507
Acid 3-metoxi-4-hidroxi-mandelic 610, 611
Acid 5-metoxi-indolacetic 514
Acid mevalonic v. mevalonat
Acid miristic 395*
Acid nalidixic 166, 218*
Acid nervonic 395*
Acid neuraminic 303, 304
Acid oleic 395*, 396
Acid onic v. aldonic
Acid orotic v. orotat
Acid orotidilic v. OMP
Acid oxalic v. oxalat
Acid oxaloacetic v. oxaloacetat
Acid α-oxoglutaric v. α-cetoglutarat
Acid palmitic 395*
Acid palmitoleic 395*
Acid acid pantoic 122
Acid pantotenic 122
Acid paracloromercuribenzoic 93
Acid pirofosforic v. pirofosfat
Acid α-pirolidin-carboxilic v. prolină
Acid pirolin-5-carboxilic 497, 498
Acid piruvic v. piruvat
Acid prostanoic 471
Acid pteroic 127
Acid pteroilglutamic v. acid folic
Acid retinoic 131
Acid sialic 304, 382
Acid stearic 395*
Acid succinic v. succinat
Acid taurochenodezoxicolic 456
Acid taurocolic v. taurocolat

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acid tetrahidrofolic v. tetrahidrofolat
Acid tetraiodotiroacetic 589, 590
Acid timidilic v. TMP
Acid timidin difosforic v. TDP
Acid timidin monofosforic v. TMP
Acid timidin trifosforic v. TTP
Acid 3α,7α,12α-trihidroxicolanic v. acid colic
Acid triiodotiroacetic 589, 590
Acid uric 290, 539*, 549, 551-553
Acid uridilic v. UMP
Acid uridin difosforic v. UDP
Acid uridin monofosforic v. UMP
Acid uridin trifosforic v. UTP
Acid urocanic 497, 498
Acid uronic v. acid alduronic
Acid vanilmandelic v. acid 3-metoxi-4-hidroxi-mandelic
Acid xantilic v. XMP
Acid zaharic v. acid aldaric
Acidoză 661, 668
Acidurie metilmalonică 126
Aciladenilat 418
Acil-CoA 266, 271, 272, 418
Acil-CoA-colesterol aciltransferază 465
Acil-CoA dehidrogenază 420, 499
Acil-CoA desaturază 433
Acil-CoA oxidază 424
Acil-CoA sintetaze 91, 418
Acil-colesterol 411
Acilgliceroli 397, 398
Acizi biliari 130, 413-415, 456-457, 518
Acizi biliari conjugaţi 414
Acizi biliari primari 456
Acizi biliari secundari 456
Acizi dezoxiribonucleici v. ADN
Acizi graşi 394-396, 417-434, 707*
Acizi graşi esenţiali 433, 710
Acizi graşi liberi plasmatici 458, 467
Acizi graşi neesterificaţi v. acizi graşi liberi plasmatici
Acizi mercapturici 518
Acizi nucleici 140
Acizi ribonucleici v. ARN
Aconitat 335
Aconitază 335
Acridină 188, 226
ACTH v. corticotropină
Actină 13*
Actinomicină D 188, 218
Activităţi bazale 704
Acţiune antirahitică 133
Adenilare 108
Adenilat ciclază 576-578
Adenilat kinază 91, 265, 271, 320, 544
Adenilosuccinat 542, 543
Adenină 140, 141, 154, 175, 539*
Adenin fosforibozil transferază 550
S-Adenozilhomocisteină 512
S-Adenozilmetionină 122, 501, 512, 517
Adenozină 142, 539*, 547
Adenozin difosfat v. ADP
Adenozin monofosfat v. AMP
3',5'-Adenozin monofosfat v. AMP_c
Adenozin monofosfat ciclic v. AMP_c
Adenozin trifosfat v. ATP
ADH v. vasopresină
ADN 128, 139, 153, 154
ADN A 157
ADN B 145, 157
ADN Z 145, 157, 158
ADN_c 172, 235, 241, 242
ADN complementar v. ADN_c
ADN circular 158
ADN girază 164, 166, 169
ADN ligază 164, 165, 167, 169
ADN metilază 173
ADN mitocondrial 160, 282, 288
ADN polimerază I 164, 167, 169
ADN polimerază II 164
ADN polimerază III 164, 167, 169-172
ADN polimerază α_172
ADN polimerază β_172
ADN polimerază γ_172
ADN polimerază δ_172
ADN polimerază ADN dependentă 164
ADN polimerază ARN dependentă v. reverstranscriptază
ADN primază 164, 167
ADN recombinant 232, 233
ADN recombinat 232, 242
ADN replicază 164, 165
ADN satelit 159
ADN superspiralat 157, 158
ADP 144, 268, 273-275, 277, 285, 488
ADP ribozilare 216
Adrenalină 130, 369, 370, 375, 564*, 608-611
Ag^+ 95
Ag v. antigen
AGL v. acizi graşi liberi plasmatici
Aglicon 307
Agonist 566
Agrecan 689
Agregate moleculare 682
Alanină 14, 15*, 22*, 122, 495, 496, 500, 515, 560, 561
β-Alanină 18*, 515
δ-ALAS v. δ-aminolevulinat sintetază
Alantoină 553
Alcaloizi 719*
Alcaloză 661, 668

Alcapton v. homogentizat
Alcaptonurie 507
Alcool dehidrogenază 71, 76, 113, 380
Aldehid dehidrogenază 380
Aldimină v. bază Schiff
Aldohexoză 296
Aldolază 45*, 323
Aldolază A 76, 323
Aldolază B 380, 381
Aldopentoză 296
Aldosteronă 564*, 612-618
Aldotetroză 296
Aldotrioză 295
Aldoză 294
Aldoreductază 381
Alizină 28
Alopurinol 146, 148, 554
Alosterie 97
Aloză 296
Altroză 296
α-Amanitină 188
Amfibolic 339, 340
Amidofosforibozil transferază 540, 541, 545, 546
Amidon 311
Amilază 13*, 76, 86, 312, 314
Amilo-1,4-1,6-glucan transferază 367
Amilo-1,6-glucozidază 314
Amilopectină 311-313
Amilo-1,4-1,6-transglicozilază 371, 372
Amiloză 311, 312
Amine biogene 513
Aminoacid 14, 707*
Aminoacid cetogen 494
L-Aminoacid decarboxilază 514
Aminoacid esenţial 711, 712*, 734*
Aminoacid esenţial limitant 712
Aminoacid glucoformator 355, 358, 494
D-Aminoacid oxidază 488
L-Aminoacid oxidază 118, 488
Aminoacid neesenţial 508
Aminoacid semiesenţial 483, 503
Aminoacil adenilat 206, 207
Aminoacil-AMP v. aminoacil adenilat
Aminoacil-ARN_{t} 197, 207, 208
Aminoacil-ARN_{t} sintetază 208
γ-Aminobutirat 514
2-Amino-6-hidroxipurină v. guanină
β-Aminoizobutirat 560, 561
δ-Aminolevulinat 18*, 521, 522, 525, 527
δ-Aminolevulinat dehidratază 522
δ-Aminolevulinat sintază 96, 521, 522, 525, 527
Aminopeptidază 481
6-Aminopurină v. adenină
Aminotransferază 71, 486
Aminozaharuri 303
Amital 276
AMP 123, 143, 269-271, 320, 539*, 542, 543
AMP ciclic v. AMP_{c}
3',5'-AMP v. AMP_{c}
AMPc 145, 220, 321, 572-574, 576-580
AMP dezaminază 548
3',5'-AMP fosfodiesterază 576, 577
Anabolism 259
Anaerob 253, 268, 274, 275, 285
Analizor de impedanţă bioelectrică 647
Androgen 612-615, 618
Androstan 412
Androstendiol 619
Δ^{5}-Androstendiol 619
Androstendionă 612, 614, 621
Androsteronă 621
ANF v. factorul atrial natriuretic
Angiotensină I 617
Angiotensină II 30*, 617, 618
Angiotensinază 618
Angiotensinogen 617, 618
Anhidrază carbonică 71, 76, 106, 110
Anhidridă 264
Anomerie 300
Antagonist 566
Anti, formă 145
Antibiotic 719
Anticodon 139, 178, 179
Anticorp v. imunoglobulină
Antidiuretic v. vasopresină
Antigen 53-55
Antimicină A 276
Antioxidant 130, 131, 135
α_{1}-Antiprotează 52
α_{1}-Antitripsină v. α_{1}-antiprotează
Antitrombină 61, 694
Antivitamină 114
Apă 643, 707*, 722, 723*
Apă legată 643, 656
Apă oxigenată 291
$Ap_{4}A$ v. diadenozin tetrafosfat
Apoenzimă 75, 120
Apolipoproteină 458
Apolipoproteina A 52*, 461*
Apolipoproteina B 52*, 461*
Apolipoproteina B48 461*
Apolipoproteina B100 461*, 463
Apolipoproteina C 461*, 462

Apolipoproteina D 461*
Apolipoproteina E 461*
Apoproteină 49
APRT v. adenin fosforibozil transferază
Arabinoză 296, 382
Arabinoză-5-fosfat 349
Arahidonat 472, 474, 475
Arginază 76, 492, 494
Arginină 17*, 20, 22*, 483, 492*, 493*, 516
Arginină-succinat 491, 493, 494
Arginină-succinat liază 492, 494
Arginină-succinat sintetază 491, 494
Arginino-succinic acidemie 494
Argininvasopresină 630
β-ARK (β-adrenergic receptor kinase) 566
Aril-sulfatază 697
ARN 139, 175, 176
ARN de transfer v. ARN_t
ARN inițiator 167, 169
ARN_m 139, 176, 177, 192, 193
ARN mesager v.ARN_m
ARN monocistronic 177
ARN nuclear de dimensiuni mici 176, 181, 193, 200
ARN nuclear heterogen 177
ARN policistronic 177
ARN poligenic 177
ARN polimerază ADN dependentă 171, 182-185
ARN polimerază ARN dependentă 201, 202
ARN polimeraza I 187
ARN polimeraza II 187
ARN polimeraza III187
ARN polimerază holoenzimă 182, 183
ARN polimerază mitocondrială 187
ARN ribozomial v. ARNr
ARNr 176, 180, 190, 191, 199
ARN ribozomal v. ARNr
ARNr 5 S 180, 199
ARNr 5,8 S 180, 199
ARNr 16 S 180, 199
ARNr 18 S 180, 199
ARNr 23 S 180, 199
ARNr 28 S 180, 199
ARNr 30 S 199, 200
ARNr 45 S 199, 200
ARNt 139, 176, 178, 179
Aromatază 622, 623
Artrită reumatismală 700
Asparagină 17*, 20, 22*, 384, 385, 499, 500, 684*, 688
Asparagin sintetază 511
Aspartat 286, 688
Aspartat aminotransferază v. GOT
Aspartat carbamil transferază 102
Aspartat transcarbamilază v. aspartat carbamil transferază
ATP 115, 123, 144, 164, 262, 268*, 271, 273, 277, 285, 319, 488
d-ATP 164
ATP-ază v. ATP fosfohidrolază
ATP-ază Na/K dependentă 76, 591
ATP fosfohidrolază 76
ATP sintetază 274, 275, 280, 281*, 288, 527
Avery, O. 153
Avitaminoză 114, 716
8-Azaguanină 146, 148
4-Azauracil 146
Azauridină 148
Azatioprin 146, 148
Azidotimidină 146, 148
Azide 277

B

B, ADN 145, 156
Bacteriofag 238
Balanță azotată 480
BamH I 234*
Banda Soret 520, 521
Bayliss, W. 562
Bază conjugată 662
Bază Schiff 26, 522
Băuturi 733, 735
Benzoat de sodiu 518
Benzoil-CoA 518
Benzoil-glicină v. acid hipuric
Betaină 27
Bibliotecă ADN_c 241, 242
Bibliotecă genomică 239, 241
Biglican 690, 691, 692*
Bilirubină 530-535
Bilirubină conjugată 533, 535, 536
Bilirubină directă 535
Bilirubină indirectă 535
Bilirubină liberă 536
Bilirubină neconjugată 535
Bilirubină serică totală 534
Bilirubindiglucuronid 533
Bilirubinmonoglucuronid 533
Biliverdină 529, 530
Biliverdin reductază 530
Biocatalizatori 67
Bioenergetică 256, 278
Biotină 123

1,3-Bisfosfoglicerat 272, 274, 323-325
2,3-Bisfosfoglicerat 105, 324, 325
Bisfosfoglicerat fosfatază 325
Bisfosfoglicerat kinază 325
Bisfosfoglicerat mutază 325
Boala Andersen 376
Boala Farber 446, 447
Boala Forbes 376
Boala Gaucher 446, 447
Boala Gilbert 536
Boala von Gierke 376
Boala Hers 377
Boala Hug 377
Boala Krabbe 446, 447
Boala Mc Ardle 377
Boala Nieman-Pick 446, 447
Boala Sandhoff 701
Boala Tangier 470
Boala Tay-Sachs 446, 447, 701
Boala cu urină cu miros de arțar (maple syrup disease) 507
Bodansky 84
Bohr, efect 106
2,3 BPG v. 2,3-bisfosfoglicerat
Bradikinină 30*
5-Bromouracil 225

C

C_3 52*
C_4 52*
C_H 56
C_L 56
Ca^{2+} 58*, 76, 370, 573, 574*, 583, 584
CAAT, caseta 187
Cadaverină 26, 514
Calcemie 592
Calcitonină 564, 594
Calcitriol v. 1,25-dihidroxicolecalciferol
Calciu extracelular 592
Calciu plasmatic 592
Calciu intracelular 592
Calciu ionizat 592
Calea Embden-Meyerhof-Parnas v. glicoliza
Calea fosfogluconatului v. calea pentozofosfaților
Calea glicerol fosfatului 437, 438
Calea glucuronatului 351
Calea LDL 465
Calea monoacilglicerolului 437
Calea pentozofosfaților 342-350
Calea poliolică 381
Calmodulină 368, 370, 584, 585
Capacitate tampon 665, 666
Capacitate termică 635
Carbamil aspartat 555, 556
Carbamil fosfat 266, 555, 556
Carbamil fosfat sintetază 555, 556
Carbamil fosfat sintetază (glutamină) 555
Carbamil fosfat sintetază mitocondrială 490, 491, 493
Carbaminoacid 27
Carboxilare 123
Carboxipeptidază 76, 481
Cardiolipină v. difosfatidil glicerol
Carență vitaminică 114
Carnitină 419
Carnitin aciltransferază 419
α-Caroten 131, 409
β-Caroten 131, 132*, 136, 409, 410
γ-Caroten 131, 409
Carotenoizi 409, 410
Catabolism 259
Catalază 76, 110, 286, 292, 519
Cataliză 69
Catecol 608
Catecolamine 363, 364, 608-611
Catecol-O-metil transferază (COMT) 610, 611
Catenă codificatoare 181
Catenă necodificatoare 181
Catepsină 485
Cazeină 481
Cât de fosforilare 277
CBP (cortisol-binding protein) 615, 623
CBP (Ca-binding protein) 597
CDP 539*
CDP-colină 441-443
CDP-diacilglicerol 441-443
CDP-diglicerid v. CDP-diacilglicerol
CDP-etanolamină 441-443
Cefalină v. fosfatidiletanolamină
Celobioză 310
Celule A 598
Celule B 598
Celule D 598
Celule F 598
Celule cromafine 608
Celule hipofizare corticotrope 624
Celule hipofizare gonadotrope 624
Celule hipofizare lactotrope 624
Celule hipofizare somatotrope 624
Celule hipofizare tireotrope 624
Celule interstițiale v. celule Leydig
Celule Leydig 618
Celuloză 721
Centrul activ enzimatic 77, 78
Centrul catalitic 78

Ceramidă 405
Ceramidază 446, 447
Cerebrozid 405, 406
Ceride v. ceruri
Ceruri 407, 408
Ceruloplasmină 45*, 52*
Cetimină v. bază Schiff
α-Cetoacid 27, 116
α-Cetoacid dehidrogenază 499, 505
β-Cetoacil-CoA 420
β-Cetoacil-CoA tiolază 420
Cetogeneză 424-426, 604
α-Cetoglutarat 115, 118, 286, 335, 487, 488, 497*
α-Cetoglutarat dehidrogenază 336, 337, 488
3-Ceto-L-gulonat 353, 354
2-Ceto-L-gulonolactonă 353, 354
3-Ceto-L-gulonolactonă 353, 354
Cetonemie 426
Cetonurie 426
Cetoză 294, 297, 711
Changeux, J.P. 97
Chargaff, E. 154
Chelaţi 138
Cheltuială energetică 704, 705*, 736*
Chilomicroni 416, 459-463, 460*
Chimotripsină 38*, 72, 74, 78, 110, 481, 485
Chimotripsinogen 481
Chiralic, centru 20, 295
Ciancobalamină 124, 125*, 501
Ciclooxigenază 473, 474
Ciclopentanoperhidrofenantren 290
Ciclul acidului citric v. ciclul acizilor tricarboxilici
Ciclul acizilor tricarboxilici 276, 330-340, 493, 521
Ciclul alanină-glucoză 359, 360
Ciclul celular 173, 285
Ciclul Cori v. ciclul lactat-glucoză
Ciclul Felig-Malette v. ciclul alanină-glucoză
Ciclul γ-glutamil 516
Ciclul Krebs v. ciclul acizilor tricarboxilici
Ciclul Krebs-Henseleit v. ciclul ureogenetic
Ciclul lactat-glucoză 360
Ciclul rodopsinei 131, 132*
Ciclul TCA v. ciclul acizilor tricarboxilici
Ciclul ureogenetic 490*
Cimetidină 514
Cisteamină 26, 515
Cisteină 16*, 20, 22*, 122, 481, 488, 495, 512, 518
Cistein dioxigenază 518
Cistină 27, 495-497
Cistin reductază 497
Cistron 177
Citidilat v. CMP
Citidină 142
Citidin difosfat v. CDP
Citidin monofosfat v. CMP
Citidin trifosfat v. CTP
Citocromi 13*, 65, 76, 91, 271, 272, 277, 519
Citocrom a 91, 129*, 272, 277, 281
Citocrom a_3 91, 272, 277, 281
Citocrom b_5 277, 433
Citocrom b_5 reductază 433
Citocrom c 48*, 65, 91, 129*, 271, 272, 278*, 281
Citocrom c_1 91
Citocrom c oxidază v. complexul respirator IV
Citocrom P_{450} 284, 290, 526, 527, 529, 612
Citozină 140, 141, 154, 175
Citrat 320, 333, 335, 427, 428
Citrat liază 335
Citrat sintază 91, 333, 335
Citrulină 18*, 491
Citrulinurie 494
Clatrină 387
Clonarea ADN 237
Clonarea genelor 232, 246-248
Clonă 233
Cloramfenicol 218*
CMP 144
d-CMP 144
CMP-N-acetil-neuraminat 446
CoA v. coenzima A
CoA-SH v. coenzima A
Cobalt 492
Cod genetic 203, 204*, 205, 206
Codoni 139, 179, 203
Codoni de iniţiere 205, 209
Codoni nonsens 205
Codoni sinonimi 205
Codoni terminatori 205
Coeficient Hill 101
Coeficient termic de reacţie 85
Coenzima 75, 114
Coenzima A 122, 123
Coenzima Q 277-281, 279*, 409
Coenzime flavinice v. FAD si FMN
Coenzime nicotinamidice v. NAD si NADP
Cofactor 75
Colagen 13*, 479, 671, 672*, 687, 692, 694*
Colagenază 671, 677
Colagenoliză 767
Colagenoză 700
Colamină v. etanolamină
Colan 413
Colecalciferol 595, 596
Colecistokinină 564, 607, 633*

Colestan 413
Colestanol 412
Colesterol esterază 415
Colesterol seric 458*
Colină 400, 515
Complex B 115
Complex enzima-substrat 69
Complex ES v. complex enzimă-substrat
Complex major de histocompatibilitate 56, 57*
Complex multienzimatic 77
Complex respirator I (v. NADH CoQ oxidoreductază) 280-282
Complex respirator II (v. succinat CoQ oxidoreductază) 280-282
Complex respirator III (v. CoQ citocrom c reductază) 280-282
Complex respirator IV (v. citocrom oxidază) 277, 280-283, 290
Complex de tranziţie 68
Compuşi macroergici 271, 272
COMT v. catecol-O-metil transferază
Condimente 731*, 733
Condroblast 671
Condroitin sulfat 682, 683*, 684*, 687, 689, 690, 693, 694
Condroitin-4-sulfat 389*, 391
Condroitin-6-sulfat 389*, 391, 392
Conformaţie anti 145
Conformaţie baie 302
Conformaţie R 100
Conformaţie scaun 302
Conformaţie sin 145
Conformaţie T 100
Conjugare mercapturică 518
Constantă de aciditate 662, 663*, 664
Constantă de bazicitate 662, 663
Constantă de echilibru 263, 264, 658, 662, 666
Constanta Michaelis 88, 90, 92
Consum de oxigen 704
Cooperare plamân-rinichi 669, 670*
Coproporfirie ereditară 528
Coproporfirii secundare 529
Coproporfirină 62
Coproporfirină III 528
Coproporfirinogen 62
Coproporfirinogen I 528
Coproporfirinogen III 528
Coproporfirinogen III oxidază 524, 528
Coprostanol 456
Coprostanonă 456
CoQ v. coenzima Q
$CoQH_2$ v. coenzima Q
CoQ-citocrom c reductază v. complexul respirator III
Corepresor 99, 222, 223
Corey, R. 36
Cori, C. 360
Cori, G. 360
Coriogonadotropină v. gonadotropină corionică
Corpi cetonici 424
Corticosteroid 612-618
Corticosteronă 614
Corticotropină 564*, 617, 624, 626, 627
Cortisol 564*, 612-617
Cosmidă 238
CP v. creatin fosfat
CPK v. creatin fosfo kinază
Creatină 516
Creatinfosfat 273, 516
Creatinfosfokinază 45, 273, 517
Creatinkinază v. creatin fosfo kinază
Creatinină 516
CRH v. hormonul de eliberare a corticotropinei
CricK, F 154, 155, 205
Criobiologie 85
Cromatină 159
Cromogranină 610
Cromoproteine 50
Cromozomi 159
Crotonază
CS v. somatomamotropină corionică
CSF (colony stimulating factor) 638
CTP 102, 164, 265, 557, 558
d-CTP 164
CTP sintetază 557, 558
Cu^{2+} 76, 503
Cuplare chimică 266, 284
Curba Michaelis 88
Căldura de combustie 708
Căldura de vaporizare 653
Căldura de topire 654

D

D, serie optică 296, 297
d- v. dezoxi
D_2 v. ergocalciferol
D_3 v. colecalciferol
1,25 $(OH)_2$ - D_3 v. 1,25 dihidroxi D_3
DAG v. diacilglicerol
DBP (D-binding protein) 595
Decarboxilare 120, 122
Decarboxilare oxidativă a piruvatului 329-333
Decarboxilază 513
Decorină 690, 691, 692*
Decuplarea fosforilării oxidative 283
Defecte metabolice 716*
Dehidroascorbat 128, 129
7-Dehidrocolesterol 133, 412, 595, 596

11-Dehidrocorticosteronă 612-614
Dehidroepiandrosteronă 612-614, 619, 620
7-Dehidroergosterol 133
Deiodurază 589, 590
Denaturare proteine 48, 49
Denaturare ADN 150, 151
Dermatan sulfat 389*, 391, 682, 683*, 684*, 687
Desmozină 680, 681*
Determinant antigenic 53
Dextrină 314
Dextrină limită 314
Dezaminare 486, 488
Dezaminare oxidativă 486
Dezoxiadenilat v. dAMP
5'-Dezoxiadenozilcobalamină 124, 125, 507
Dezoxiadenozină 124, 142
Dezoxicitidilat v. d-CMP
Dezoxicitidină 142
11-Dezoxicorticosteronă 614
11-Dezoxicortizol 614
Dezoxiguanozină 142
Dezoxiguanozin monofosfat v. d-GMP
Dezoxiribonucleotide 143, 544, 545
Dezoxiribonucleozide 142
Dezoxiriboză 140, 304
6-Dezoxi-L-galactoză v. fucoză
Dezoxiguanilat v. dGMP
Dezoxitimidilat v. dTMP
Dezoxitimidină 142
Dezoxitimidin monofosfat v. dTMP
Dezoxizaharuri 304
Diacilglicerol 397, 573, 574*, 581-583, 601, 602
Diadenozintetrafosfat 146, 147
Diastereoizomeri v. diastereomeri
Diastereomeri 296
Difosfatidil-glicerol 404
Difosfoglicerat v. bisfosfoglicerat
Digestia glucidelor 312, 314, 315
Digestia lipidelor 415, 416
Dihidrobiopterină 503, 609
Dihidrofolat 558
Dihidrofolat reductază 558
Dihidrolipoat dehidrogenază 118
Dihidroorotat 556, 557
Dihidroorotat dehidrogenază 556, 557
Dihidrosfingozină 405
Dihidrotestosteronă 618, 619
Dihidrouridină 179
Dihidroxiacetonă 297, 346
Dihidroxiaceton fosfatul 286, 347, 380
1α,25-Dihidroxicolecalciferol 133, 134, 564*, 595-598
24,25-Dihidroxicolecalciferol 134, 597
1α,25-Dihidroxi-D_3 v. 1α,25-Dihidroxicolecalciferol
2, 4-Dihidroxi-5-metil-pirimidină v. timină
2, 4-Dihidroxi-pirimidină v. uracil
2, 4-Dihidroxi-pirimidin-carboxilat v. orotat
2, 4-Dihidroxi-purină v. xantină
Diiodotironină 589, 590
Diiodotirozină 587-589
Diizopropilflorfosfatul 93
Dimetilalilpirofosfat 453
2,4 Dinitrofenol 289
Dioxid de carbon 106, 253
Dipeptidază 481
Dipol 650, 651
Disialogangliozid 406
Dislipidemie v. dislipoproteinemie
Dislipoproteinemie 467-471
Disulfură 27
Dizaharid 308
Dizaharid dicarbonilic 308
Dizaharid monocarbonilic 308
Dizaharid nereducător 308
Dizaharid reducător 308
Dizaharidază 314, 315
Dolicol 384, 409
Dolicol fosfat 384
Domenii structurale 44, 45
Donor de protoni 664
DOPA 609
DOPA decarboxilază 609
Dopamină 608, 609
Dopamin hidroxilază 609
Down regulation 566
DSIP (delta sleep inducing peptide) 633*
Dubla elice de ADN 155, 156, 682
Duplex v. dubla elice

E

E v. energie internă
E v. potențial redox
E_o v. potențial redox standard
Echilibru acido-bazic 664, 669, 670
Echilibru energetic 704
Echivalent reducător 277, 281-284, 286
EcoR I 234*, 235
EcoR II 234*
Ecuație Henderson-Hasselbalch 664, 665
Efect Bohr 106
Efect cooperativ 102
Efect Wolf-Chaikoff 590
Efect alosteric 99-102
Efect heterotrop 99, 102
Efect homotrop 99, 102

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Efector alosteric 99, 102
EGF v. factor de creştere al epidermei
Eicosanoizii 471-478
Elastază 481, 680
Elastină 481, 671, 672*, 680, 681*, 682*, 687, 694
Electroforeza serului 51
Elemente minerale 707*, 735*
α-Elicea lanţurilor polipeptidice 36-39
Elongarea acizilor graşi 432-433
Elongarea ADN 165, 167
Elongarea ARN 182, 185
Elongarea lanţului polipeptidic 206, 210-213
Enantiomeri 296
Encefalină 633
Endoglicozidază 697
Endonuclează 153
Endopeptidază 72, 481, 482
Endoperoxid prostaglandinic 474
Endorfină 633, 634
α-Endorfină 626, 633*, 634
β-Endorfină 626, 633, 634
γ-Endorfină 626, 633, 634
α-neo-Endorfină 633
β-neo-Endorfină 633
Energie de activare 69, 85
Energie disponibilă 708*
Energie internă 262
Energie legată 256
Energie liberă 262-266
Energie liberă de reacţie standard 263, 264
Enhancer (secvenţă) 187, 188
Enoil-CoA 420
Enoil-CoA hidratază 420
Enolază 326
Entalpie 68, 262
Enteroglucagon 607
Enterokinază v. enteropeptidază
Enteropeptidază 482, 483
Entropie 262, 263
Enzimă de deramifiere 367
Enzimă malică 428
Enzimă de ramifiere 371, 372
Enzime alosterice 99
Enzime bifuncţionale 367
Enzime digestive 481
Enzime inductibile 88, 219, 223
Enzime lizozomale 291
Enzime proteolitice 481
Enzime represibile 219, 223
Enzime de restricţie 153, 233, 234
Epimerază 113, 378, 696
Epimeri 296
Epimerizare 296
Epinefrină v. adrenalină
erb 641
erb A 642
erb B 642
Ergocalciferol 133
Ergosterol 133
Eritromicină 218*
Eritropoetină 638
Eritroză 296
Eritroză-4-fosfat 346
Eritruloză 297
ES v. complex enzima-substrat
Estran 412
Estradiol 564*, 622-624
Estriol 623, 624
Estrogen 572*, 622-624
Etanolamină 26, 515
Etiocolanolonă 621
Exoglicozidază 697
Exon 160, 177, 189
Exopeptidază 72, 481, 482

F

Factor antihemofilic 58*
Factor atrial natriuretic 581
Factor Christmas 58*
Factor de coagulare 58*, 137, 138
Factor de creştere (GF) 564*, 585, 634-642, 694
Factor de creştere a epidermei (EGF) 585
Factor de creştere a fibroblaştilor (FGF) 635
Factor de creştere a nervilor (NGF) 638
Factor de creştere eliberat de plachete (PDGF) 636
Factor de creştere insulin-like (IGF) 637
Factor de creştere insulin-like I (IGF-I) 585, 637
Factor de creştere insulin-like II (IGF-II) 637
Factor de cuplare 282
Factor de eliberare a tropinelor hipofizare v. hormon de eliberare a tropinelor hipofizare
Factor de elongare a lanţului polipeptidic 210
Factor Hageman 58*
Factor inhibitor al eliberarii de tropine hipofizare v. hormon eliberator de tropine hipofizare
Factor de iniţiere al sintezei proteice 208, 209
Factor necrozant al tumorilor 640
Factor rho 186
Factor sigma 183
Factor stabilizator al fibrinei 58*, 61
Factor Stuart Prower 58*
Factor transformant β (TGF β) 636
FAD/$FADH_2$ 116, 117*, 118, 276, 277, 282, 286, 488
Fag 238, 276, 277, 282
Fagocitoza 291, 343
Farnesol 408

S-Farnezilare 216, 217
Farnezil pirofosfat 217, 218
S-Farnezil transferază 216, 217
Fe^{2+} 76, 277, 278, 281,503, 520, 521, 524
Fe^{3+} 76, 277, 529
Feed-back 98
Fenilacetat 506, 518
Fenilacetilglutamină 506
Fenilalanină 15*, 19, 22*, 482, 503*, 506*
Fenilalanin hidroxilază 503, 506
Fenilcetonurie 506
Feniletanolamin-N-metil transferază 609
Fenil-lactat 506
Fenil-piruvat 506
Ferihem 290
Feritină 13*, 529
Fermenţi 67
Ferochelatază 2
Ferohem 290
α_1-Fetoproteină 52*
FGF v. factor de creştere a fibroblaştilor
FH_4 v. folat
Fibre alimentare 707*, 720
Fibre de colagen 675, 677, 679
Fibre structurale 720
Fibrilă de colagen 677, 679
Fibrină 58*, 61
Fibrinogen 13*, 48*, 57-62, 58*, 694
Fibrinoliză 62
Fibrinopeptide 60, 61
Fibroblast 671, 680, 702
Fibroină 40
Fibromodulină 690-692
Fibronectină 65, 66, 687, 694*, 697
Filochinonă 136, 137*, 408
Fischer, H. 80
Fitohormoni 719*
Fitoncide 719*
Flavinadenindinucleotid v. FAD
Flavinmononucleotid v. FMN
Flavinnucleotide 117
Flavoproteine 118, 279, 281
5'-Florouracil 146
FMN 117*, 279, 281
$FMNH_2$ 118
H_4-Folat v. tetrahidrofolat
Folat 94, 126, 129
N-Formil-metionină 208, 209
N-Formil-metionil-ARN_t 208, 209, 210
N-Formil-tetrahidrofolat 210
N-Formimino-tetrahidrofolat 128
Fosfatază 107
Fosfatază alcalină 45*
Fosfatid v. glicerofosfolipid
Fosfatidil-colină 400*, 401
Fosfatidil-etanolamină 400*, 402
Fosfatidil-gliceroli 404
Fosfatidil-inozitol 402, 403
Fosfatidil-inozitol-4-fosfat 403
Fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat 403
Fosfatidil-serină 400*, 402
3-Fosfoadenozil-5-fosfosulfat 391, 392
Fosfocreatină v. creatin fosfat
Fosfodiesterază 576, 577
Fosfoenolpiruvat 272, 273, 275, 326, 355-357
Fosfoenolpiruvat carboxikinază 355-357, 362, 362, 363
Fosfofructo-1-kinază 319, 320, 355, 362
Fosfofructo-2-kinază 321, 362
Fosfofructo-2-kinază/fructozo-2,6-bisfosfatază 321
3-Fosfogliceraldehidă v. gliceraldehidă-3-fosfat
3-Fosfogliceraldehid dehidrogenază v. gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază
2-Fosfoglicerat 324, 325, 380
3-Fosfoglicerat 274, 286, 325, 326, 511
Fosfoglicerat kinază 274, 324
Fosfoglicerat mutază 326
Fosfogliceride v. glicerofosfolipide
Fosfoglicerol v. glicerol fosfat
6-Fosfogluconat 305, 344, 345
6-Fosfogluconat dehidrogenază 345
6-Fosfogluconolactona 344
Fosfoinozitid v. fosfatidilinozitol
Fosfokinază 107
Fosfolipază 415, 416, 443
Fosfolipază A_1 443, 444
Fosfolipază A_2 91, 443, 444
Fosfolipază C 443, 444, 581, 582, 601, 602
Fosfolipază D 443, 444
Fosfolipide serice 458*
Fosfoproteine 49
Fosfoprotein fosfatază v. protein fosfatază
5-Fosforibozil-β-1-amină 540, 541
5-Fosforibozil-α-1-pirofosfat v. PRPP
Fosforibozil transferaze 550
Fosforilare 107
Fosforilare la nivel de substrat 274*, 324, 326, 336
Fosforilare oxidativă 274*, 278
Fosforoliză 366
Fosfotransferază 76
Fotoliză 230
Fotosinteză 259
$F-1,6-P_2$ v. fructozo-1,6-bisfosfat
Fragmente Okazaki 167, 169
Franklin, R. 154
Fredrickson 468
Fructokinază 379
Fructofuranoză 302
Fructoză 297, 301, 302, 379-382

Fructozo-1,6-bisfosfat 306, 307, 319, 321, 323, 326, 347, 357
Fructozo-2,6-bisfosfat 321, 322, 364
Fructozo-1,6-bisfosfatază 322, 357, 362
Fructozo-2,6-bisfosfatază 321, 322
Fructozo-1,6-bisfosfat liază v. aldolază
Fructozo-1-fosfat 380
Fructozo-6-fosfat 306, 307, 319, 346, 347, 381
Fructozidază 314
Ftiocol 137
Fumarat 337, 492, 505
Furan 299
Furanoză 299
Funcţii de stare 261

G

G, v. energie liberă
G, proteine 217, 573-575
G_0, fază a ciclului celular 173
G_1, fază a ciclului celular 173
G_2, fază a ciclului celular 173
GABA v. acid γ-aminobutiric
Galactitol 379
Galactocerebrozid 405, 406
Galactocerebrozidază 447
Galactocerebrozidoză v. boala Krabbe
Galactokinază 377, 379
Galactopiranoză 302
D-Galactoză 296, 377-379, 382, 684*
Galactoză-1-fosfat 377, 379
Galactoză-1-fosfat-uridil transferază 378
D-Galactozamină 303, 382, 388, 684*
Galactozemie 379
β-Galactozidază 219, 314, 447, 697
Galactozurie 379
Gangliozid 406, 407, 446
Gangliozidoza GM_1 446, 447
Gangliozidoza GM_2 v. boala Tay Sachs
Gastricsină 481
Gastrină 564*, 607
GC, casetă 187
GD v. disialogangliozid
GDP 272, 275, 488
Genă 159
Genă operator v. operator
Genă promotor v. promotor
Genă reglatoare 220
Genă structurală 160
Genom 159, 160
Geranil pirofosfat 453
Geraniol 408
Gestagen, hormon v. progestine
GF v. factor de creştere
GH v. somatotropină
GH-RH v. hormon eliberator al somatotropinei
GH-RIH v. somatostatină
GIP (gastric inhibitory polypeptide) 607
Gla 59
Gliceraldehidă 295, 296, 380
Gliceraldehidă-3-fosfat 323, 346, 347
Gliceraldehidă-3-fosfat dehidrogenază 113, 323
Glicerat kinază 380
Glicerid v. acilglicerol
Glicerofosfolipide 399-404, 441-444
Gliceroidooctuloză-1,8-bisfosfat 349, 350
Gliceroidooctuloză-8-fosfat 349, 350
Glicerol 355, 359, 397, 434, 435
Glicerol fosfat 286, 359, 399, 435
Glicerol fosfat dehidrogenază 286
Glicerol kinază 380, 434, 435
Glicină 14, 15, 22*, 484, 495, 496, 516, 517, 521, 522, 673
Glicin-amidin-transferază 516
Glicocol v. glicină
Glicocolat 414, 456, 457
Glicoforină 387
Glicogen 122, 311-313, 364-377
Glicogen fosforilază 45*, 107, 366
Glicogen fosforilază A 368
Glicogen fosforilază B 368, 369
Glicogen fosforilazofosfatază 368
Glicogen fosforilazokinază 368, 369
Glicogenină 371, 372
Glicogenogeneză 371-377
Glicogenoliză 122, 366-370, 604
Glicogenoze 376, 377
Glicogen sintază 13*, 107, 371
Glicogen sintază A 373
Glicogen sintază B 373
Glicogen sintazofosfatază 373
Glicogen sintazokinază 373
Glicolaldehidă 346, 347
Glicolipide 400*, 405
Glicoliză 318-329
Glicoliză anaeroba 327
Glicoproteine 50, 382-388
Glicoproteina benzii III 387, 388
$α_1$-Glicoproteină 52*
Glicosfingolipide 405-407
Glicozaminoglicani 388, 682, 687, 688*, 694
Glicozid 307, 719*
Glicozidaze 385, 386
Glicozil-fosfatidil-inozitol 601, 602
Glicozil-fosfo-inozitol 601, 602
Glicozil transferază 385, 386
Globină 224
$α_1$-Globuline serice 51
$α_2$-Globuline serice 51

β-Globuline serice 51
γ-Globuline serice 51
Glucagon 363, 364, 369, 370, 375, 564*, 603-607
1,4-Glucan-fosfat-glucozil transferază v. glicogen fosforilază
Glucide 294, 708*, 709, 735*
Glucitol v. sorbitol
Glucocerebrozid 405
Glucocorticoizi 290, 363, 364, 485, 572*, 612-617, 696
Glucokinază 317, 318, 355, 363, 601
Glucomutază 367
Gluconeogeneza 351, 355-365, 604
Glucopiranoză 302
Glucoză 296, 301, 314, 315, 316, 526
Glucozamină 303, 382, 388, 601, 602, 684*
Glucozo-1-fosfat 71, 351, 366, 367, 371
Glucozo-6-fosfat 71, 306, 307, 317-319, 344, 367
Glucozo-6-fosfatază 71, 357, 363, 367
Glucozo-6-fosfat dehidrogenază 71, 344, 351
Glucozo-6-fosfat izomerază 71, 319
α-Glucozidază 314
1,6-Glucozidază 367
Glucuronat 136, 306, 351, 353, 533, 535, 684*
β-Glucuronid v. β-glucuronozid
Glucuronidare 352, 533
β-Glucuronidază 533, 697, 701
Glucuronil transferază v. glucuronozil transferază
Glucuronoconjugare v. glucuronidare
Glucuronoconjugati v. glucuronozizi
Glucuronozid 137, 352
Glucuronozil transferază 352, 353, 533
Glutamat 126, 138, 286, 487, 499, 508
Glutamat decarboxilază 514
Glutamat dehidrogenază 91, 111, 537
Glutamat-oxaloacetat transaminază 111, 286, 487, 499, 537
Glutamat-piruvat transaminază 111, 487, 537
γ-Glutamil-cistein-sintetază 515
γ-Glutamil transpeptidază 111, 516
γ-Glutamil-cisteinil-glicină v. glutation
Glutaminază 489
Glutamină 17*, 20, 22*, 361, 489, 497, 510, 517
Glutaminsintetază 45*, 107, 108, 489, 494, 510
Glutation 30*, 292, 293, 515
Glutation oxidat 343, 344
Glutation redus 343, 344
Glutation-insulin transhidrogenază 600
Glutation peroxidază 136, 292, 343, 344
Glutation reductază 293, 343, 344
Glutation sintetază 515
GM v. monosialogangliozid
GMP 143, 539*, 542, 543
dGMP 143
GMP ciclic v. GMPc
GMPc 145, 573, 574*, 580, 581
GMPc fosfodiesterază 580, 581
GnRH v. hormonul eliberator al gonadotropinelor
GNG v. gluconeogeneza
Gonadotropine 564*, 624, 629, 630
Gonadotropină corionică (placentară) 629
Gonan 411
5α-Gonan 411
5β-Gonan 411
GOT v. glutamat-oxaloacetat transaminază
GPT v. glutamat-piruvat transaminază
Grupare prostetică 277
GSH v. glutation redus
GSSG v. glutation oxidat
GT v. trisialogangliozid
GTP 164, 204, 205, 206, 208, 275, 488
dGTP 164
Guanază v. guanin dezaminază
Guanidină 20
Guanilat v. GMP
Guanilat ciclază 580, 581
Guanină 140, 141, 154, 175, 539*, 549, 550
Guanin dezaminază 548
Guanozină 142, 539*, 547
Guanozin difosfat v. GDP
Guanozin monofosfat v. GMP
5',3'- Guanozin monofosfat v. GMPc
Guanozin tetrafosfat 146
Guanozin trifosfat v. GTP
Guanozin-5'-trifosfat-3'-difosfat 146, 147
L-Gulonat 128, 353, 354
L-Gulonolactona 353, 354
Gulonolacton oxidază 353
Guloză 296
Gume 720, 721
Guta 553, 554

H

H v. entalpie
Hae III 234*
Haptoglobină 52*
Haworth, formule 300
Hb v. hemoglobină
HDL v. lipoproteine cu densitate mare
HDL-colesterol 464*
Helicază 164, 169, 170
Hem 62, 75, 218, 277, 519-521, 525, 529
Hem a 520
Hem b 520
Hem c 520
Hem catabolism 529
Hem reglarea biosintezei 525

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hemiceluloză 721
Hemoglobină 13*, 43*, 45*, 48*, 62, 64, 102, 129, 224, 277, 290, 479, 519, 520, 529, 665, 669
Hemoglobina A_2 105
Hemoglobina E 105
Hemoglobina F 105
Hemoglobina M 232
Hemoglobina S 231, 232
Hemoglobine mutante 231
Hemoproteine 62
Hem oxigenază 529
Hem sintetază 524, 527, 529
Henderson-Hasselbalch, ecuaţie 664, 665
Heparansulfat 389*, 682, 684*, 687, 693
Heparină 389*,391, 393, 682, 684*, 687
Heptoză 294
Hertone 159
Heteroagregate 686
Heteroglican 311
Heteroproteină 49
Hexokinază 271, 317, 355
Hexokinază-D v. glucokinază
Hexoză 294
Hexozaminidază 447
HGPRT v. hipoxantin-guaninfosforibozil transferază
Hialuronan 689
Hialuronat 389*, 390, 391, 682, 683*, 684*, 687
Hialuronidază 391
Hibridare moleculară 152
Hidraţi de carbon v. glucide
Hidrazonă 289
Hidrocortizon v. cortisol
Hidrolază 112, 289
Hidrolază lizozomală 697
Hidroperoxid 398
Hidroperoxid lipidic 398
Hidroperoxieicosatetraenoat 475, 476
β-Hidroxi-acil-CoA 420
β-Hidroxi-acil-CoA dehidrogenază 420
Hidroxializină 678*
2-Hidroxi-4-amino-pirimidină v. citozină
β-Hidroxibutirat 424
β-Hidroxibutirat dehidrogenază 424
Hidroxicobalamină 124
25-Hidroxicolecalciferol 134, 595, 596
p-Hidroxifenilalanină v. tirozină
α-Hidroxihemină 529
Hidroxiindol-O-metil transferază 632
Hidroxil glicozidic 298
Hidroxil semiacetalic v. hidroxil glicozidic
Hidroxilare 289, 290
1α-Hidroxilază 595-597
11β-Hidroxilază 614, 615
17α-Hidroxilază 612, 615
18-Hidroxilază 614, 615
21-Hidroxilază 614, 615
24-Hidroxilază 597
25-Hidroxilază 596
Hidroxilizină 129*, 673
3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA v. HMG-CoA
Hidroxiprolină 129*,484, 673
6-Hidroxi-purină v. hipoxantină
3β-Hidroxisteroid dehidrogenază 614
18-Hidroxisteroid dehidrogenază 612, 615
17α-Hidroxipregnenolonă 614, 615
17α-Hidroxiprogesteronă 614
5-Hidroxitriptamină v. serotonină
Hidroxitriptofan 129, 632
25-Hidroxivitamină D_3, vezi 25 hidroxicolecalciferol
Hind II 153
Hind III 234*
Hiperamoniemie 494
Hiperargininemie 494
Hiperbilirubinemie 534-537
Hiperbilirubinemie cu bilirubină conjugată 536
Hiperbilirubinemie cu bilirubină neconjugată 535
Hiperbilirubinemie mixtă 536
Hiperbilirubinemie toxică 535
Hiperlipidemie 468
Hiperlipoproteinemii familiale 468-470
Hiperoxalurie 507
Hiperlipoproteinemie de tip I 468, 470
Hiperlipoproteinemie de tip II 468, 470
Hiperlipoproteinemie de tip III 468, 470
Hiperlipoproteinemie de tip IV 468, 470
Hiperlipoproteinemie de tip V 468, 470
Hipolipoproteinemie familială 470, 471
Hipoxantină 539*, 549, 550
Hipoxantin-guanin fosforibozil transferază 550
Histamină 26, 514
Histidină 16*, 19, 22*, 483, 497, 669
Histidin amonioliază 498
Histone 13*, 48*, 159
Histona H_1 160-162
Histona H_{2A} 160-162
Histona H_{2B} 160-162
Histona H_3 160-162
Histona H_4 160-162
HMG-CoA 425, 451
HMG-CoA liază 425
HMG-CoA sintază 425
HMG-CoA reductază 451, 452
Holoenzimă (ARN polimerază) 183
Homoagregate 686
Homocisteină 18*,125
Homocistein-metiltransferază 126
Homocistinurie 126
Homoglicani 311

Homogentizat 507
Homogentizat oxidază 505, 507
Homoserină 512
Hormon 542-562
Hormon adrenocorticotrop v. corticotropină
Hormon antidiuretic v. vasopresină
Hormon autocrin 563
Hormon calciotrop 592-598
Hormon de creştere v. somatotropină
Hormon eliberator al tropinelor hipofizare (RH) 625
Hormon eliberator al corticotropinei 617, 625
Hormon eliberator al GH 625
Hormon eliberator al gonadotropinelor 621, 623, 625
Hormon eliberator al tireotropinei 30*, 590, 591, 625
Hormon endocrin 563
Hormon foliculostimulant 621, 623, 629, 630
Hormon lactogen v. prolactină
Hormon luteinizant 621, 623, 629, 630
Hormon paracrin 563
Hormon paratiroidian v. parathormon
Hormon stimulator al melanocitelor v. MSH
Hormon tireotrop v. tireotropină
Hpa II 234*
HRE (hormone-responsive-element) 188, 570, 571, 591
Humulină 243

I

Icter fiziologic 535
Icter hemolitic 536
Icter hepatocelular 536
Icter idiopatic cronic 536
Icter neonatal 535
Icter obstructiv 536
Icter toxic 535
Idioţie fenilpiruvică 507
IDL v. lipoproteine cu densitate intermediară
Idoză 296
α-L-Iduronat 388, 391, 684*
Iduronat sulfatază 697
α-L-iduronidază 697, 701
Ig v. imunoglobulină
IGF v. factor de creştere insulin-like
IGF-I 585, 637
IGF-II 637
IGF-BP (IGF-binding protein) 637
IL v. interleukine
Imidazol 19, 123, 669
Imidazolon-propionază 499
Iminoacizi 488
IMP 539*, 540-542
Imunoglobulină 13*, 53, 54-57
Imunoglobulină A 52*, 54
Imunoglobulină D 54
Imunoglobulină E 54
Imunoglobulină G 52*, 54
Imunoglobulină M 52*, 54
Imuran v. azatioprin
Indol 19
Inductor 219
INF v. interferon
Inhibitor alosteric 98, 99
Inhibitor competitiv 94
Inhibitor de fosfatază-1 373, 374
Inhibitor MAO 514
Inhibiţie alosterică 98, 99
Inhibiţie competitivă 92, 93
Inhibiţie ireversibilă 92, 93
Inhibiţie necompetitivă 94
Inhibiţie reversibilă 92
Iniţierea replicării ADN 165, 166, 167
Iniţierea transcrierii ADN 182, 183
Iniţierea sintezei proteice 206, 208-210
Inozină 179, 539*, 547
Inozin monofosfat v. IMP
Inozitol 402, 403
1-Inozitol fosfat 601
Inozitol fosfatide v. fosfatidil-inozitoli
1,4,5-Inozitoltrisfosfat 573, 574*, 581-585
Insulină 13*, 32*, 38*, 48*, 237, 364, 375, 485, 564*, 598-603, 696
Insulin-like growth factor v. factor de creştere insulin-like (IGF)
Interacţie hidrofobă 34, 35, 657*
Iod 587, 588
Iodacetamidă 93
Iodoacetat 323
Iodotironină 586
Iodotirozină 587
Ion hidroniu 658
Integrine 66
Interferon 640, 641
Interferon α 640, 641
Interferon β 640, 641
Interferon γ 640
Interleukină 639-640
Interleukină 1, 639
Interleukină 2, 639
Interleukină 3, 639
Interleukină 4, 639
Interleukină 6, 639
Interleukină 8, 640

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Intermediar energetic comun 268, 269, 284
Intron 160, 177, 189-196
IP_3 v. inozitoltrisfosfat
Izoaloxazină 117
Izocitrat 335
Izocitrat dehidrogenază 91, 110, 335, 336
Izodesmozină 680, 681*
Izoenzime 77
Izoleucină 14, 15*, 22*, 97, 494, 495, 499, 500
Izomerază 112, 124
Δ^5-Δ^4-Izomerază 614, 615
Izomeria cis-trans a acizilor graşi nesaturaţi 395, 396
Izomeria α,_β 410, 411
Izopentenil-pirofosfat 451, 453, 454
Izopren 278, 407
Izopren biologic activ v. izopentenil-pirofosfat
Izotiocianat 289
Izovaleril-CoA-dehidrogenază 507

J

Jacob, F. 97, 177, 219

K

Kanamicină 218*
Katal 84
Kcat 90
Kendrew, J. 42
Keratan sulfat 389*, 682, 683*, 684*, 687, 689, 691
Keratină 38
Kernicter 535
Khorana 203
Ki 93
Kinaze 70, 274
Km v. constanta Michaelis
Koshland, D.E.Jr. 80
Krebs, H. 333

L

L, serie optică 297
Labferment 481
Lactam 140
Lactat 72, 327, 355
Lactat dehidrogenază 13*, 45*, 72, 77, 111, 113, 327
Lactim 140
Lactocerebrozidază 447
Lactoflavină v. riboflavină
Lactază 314, 315
Lactoza 219, 310
Laminină 687, 694*
Lanosterol 451, 454, 455
Lanţ respirator mitocondrial 119, 275*
Lanţ respirator nefosforilant 290
Lanţuri α (din colagen) 673, 674
Lanţuri α_(din hemoglobina A_1) 46
Lanţuri β_(din hemoglobina A_1) 43*, 46
Lanţuri H (din imunoglobuline) 54
Lanţuri L (din imunoglobuline) 54
LCAT v. lecitin-colesterol aciltransferază
LDH v. lactat dehidrogenază
LDL v. lipoproteine cu densitate mică
LDL-colesterol 464*
Lecitine v. fosfatidil-coline
Lecitin-colesterol aciltransferază 110, 464
Legatură de hidrogen 34, 155, 651
Legatură diglicozidică 309
Legatură fosfat diesterică 148
Legatură glicozidică 689, 690
Legatură α-1,4-glicozidică 311
Legatură α-1,6-glicozidică 311
Legatură glucozaminidică 390, 689, 691
Legatură glucuronidică 390
Legatură intermoleculară 652
Legatură intramoleculară 653
Legatură încrucişată 677, 678*
Legatură macroergică 122, 123, 269, 272, 273, 275
Legatură monoglicozidică 309
Legatură polară 650
Legatură tiolesterică 122
Leucină 14, 15*, 22*, 482, 486, 500*, 502*, 690, 691
Leucodistrofie metacromatică 446, 447
Leucotrienă 471, 710
Leucotrienă A_4 473, 475
Leucotrienă B_4 475, 478
Leucotrienă C_4 475, 478
Leu-encefalină 633*
LH v. hormon luteinizant
LH/FSH-RH v. hormon eliberator al gonadotropinelor
Liaze 112
Lichid amniotic 702
Lichid interstiţial 645, 646
Ligandină v. proteina Y
Ligaze 112
Lignină 721
Lineweaver-Burk, ecuaţie 92
Linoleil-colesterol 464

Lipază 415
Lipază hormon-sensibilă v. triacilglicerol lipază
Lipide 394-478, 708, 710, 735*
Lipide nesaponifiabile 394, 407-415
Lipide plasmatice 457-471, 458*
Lipide saponifiabile 394
Lipidoză 446
Lipoat dehidrogenază 330, 331
Lipoil reductaz-transacetilază 330, 332-334
Lipoliză 436
Lipoproteine 50, 130
α-Lipoproteine v. lipoproteine cu densitate mare
β-Lipoproteine v. lipoproteine cu densitate mică
Lipoproteine cu densitate foarte mică 459, 460*, 461, 463, 464
Lipoproteine cu densitate intermediară 464
Lipoproteine cu densitate mare 459, 460*, 461, 466-467
Lipoproteine cu densitate mică 459, 460*, 461, 464-466
Lipoprotein lipază 110, 462, 463, 602
Lipotropină 626
Lipoxigenază 475, 476
Lizil aldehidă 680
Lizil hidroxilază 673
Lizină 17*, 20, 22*, 129*, 483, 486, 502, 673
Lizin-norleucină 680, 681*
Lizin-vasopresină 630
Lizofosfatide 401
Lizolecitine 401
Lizozim 48*, 74, 82
Lizozomi 485
Lixoză 296
Locus v. situs
Lovastatin 211, 452
β-LPH 626, 627, 633, 634
γ-LPH 626, 627, 634
LT v. leucotrienă
LTA_4 v. leucotrienă A_4
LTB_4 v. leucotrienă B_4
LTC_4 v. leucotrienă C_4
Lynen, F. 418

M

M, fază a ciclului celular 170
Mac Loed, 153
Macrofage 291
α_2-Macroglobulină 52*, 61
Macrominerale esențiale 716, 717*
Malat 94, 286, 337
Malat dehidrogenază 286, 337
Malnutriție 713
Malonat 94, 337
Malonil-CoA 426, 428-432
Maltază 314
Maltoză 309
Mamotropină v. prolactină
Manitol 305
Manoză 296, 382, 684
Manozamină 303
MAO v. monoaminoxidază
MAP kinază 585, 586
Matrice extracelulară 671, 682, 691, 692, 698, 699
Maxam si Gilbert, tehnică 248, 249, 250
McCarty, 153
Mediu intern 643
Melanotropină 626, 627
Melatonină 632
Membrană internă mitocondrială 280, 282
Menachinonă 137, 408
Menadionă 137
Mercaptid 28
6-Mercaptopurină 146
Mesager prim 572, 573
Mesager secund 572, 573
Meselson-Stahl (experiența) 162, 163
Metabolism bazal 704
Metaloenzime 75
Metaloflavoproteine 118
Metaloproteine 50
Met-encefalină 633*, 634
Methemoglobină 129*, 226
N^5, N^{10} -metenil- FH_4 128
Metil-citidină 179
5-Metil-citozină 173
Metil-cobalamină 124
β-Metil-crotonil-CoA carboxilază 123
N^5, N^{10} - Metilen-FH_4 128, 558
N^5-Metil-FH_4 126, 494
Metil-glucopiranozid 307
7-Metil-guanozină 197, 200, 215
Metilmalonic acidurie 507
Metilmalonil-CoA 125, 499, 507
Metilmalonil-CoA mutază 126, 499, 501, 507
5-Metiluracil v. timină
Metionină 17*, 20, 22*, 122, 125, 215, 481, 486, 499*, 501*
5-Metoxi-N-acetilserotonină v. melatonină
Mevalonat 451
Mevalonat-3-fosfo-5-pirofosfat 453
Mevinolin v. lovastatin
Mezobilirubinogen v. urobilinogen
Mezoinozitol 402, 403
Mg^{2+} 270

MHC v. complex major de histocompatibilitate
MHC clasa I 56, 57*
MHC clasa II 56, 57*
Microfibrile de colagen 677, 679
β_2-Microglobulină 52*
Microminerale v. oligoelemente esenţiale
Microorganisme 291
Mieloperoxidază 291
Minerale 716
Mineralocorticoizi 290, 612-618
Mioglobină 38*, 42*, 43, 48*, 63, 64, 102, 277, 519, 520
Mioinozitol v. mezoinozitol
Miokinază v. adenilat kinază
Miozină 13*, 45*, 48*
MIT v. monoiodotirozină
Mitchell, P. 284
Monoacilglicerol 389, 390
Monoaminoxidază (MAO) 91, 610, 611
Monod, J. 177, 219
Monoglicerid v. monoacilglicerol
Monoiodotironină 389, 390
Monoiodotirozină 587, 588, 589
Monosialogangliozid 406
Monourat de sodiu 552, 553
Monoxigenază 289
Monozaharide 294, 295, 305
Motilină 68
MSH v. melanotropină
Mucilagii 720, 721
Mucopolizaharide 701
Mucopolizaharidoze 391
Mullis, K. 246
Mutaţie 225, 230-232, 288, 291
Mutaţie prin deleţie 231
Mutaţie prin inserţie 231
Mutaţie prin substituţie 230
Mutaţie prin transversie 231
Mutaţie prin tranziţie 230, 231
Mutază 124

N

NAD 116
NAD+ 116, 119, 276, 277, 280, 283, 286, 287, 487
NADH 119, 276, 277, 280, 283, 286, 287
NADH-CoQ reductază 280
NADP 119
NADP+ 119, 127, 286, 289*, 290*, 487
NADPH 286, 289*, 290*, 342, 343, 344, 345, 349
NADPH oxidază 291, 343, 529, 530
NANA v. acid N-acetil-neuraminic
Natriopeptină v. factorul atrial natriuretic
Naveta glicerol-fosfat 286
Naveta malat-aspartat 286
NDP v. nucleozid difosfat
Necesar energetic 706*
Necesar nutritiv 703
Necesar vitaminic 714, 715*
Nefrolitiază 507
Neomicină 218*
Neurofizină 630, 631
Neurofizină I 630, 631
Neurofizină II 630, 631
Neuropeptide 633*
Neutrofile 291
NGF v. factorul de creştere al nervilor
Niacină 118, 503
Nicotinamidă 118
Nicotinamid-adenin dinucleotid v. NAD
Nicotinamid-adenin dinucleotid fosfat v. NADP
Nierenberg, M. 203, 204
Nitrozamine 130
NMP v. nucleozid monofosfat
NO v. oxid de azot
NO sintetază 581
Noradrenalină 290, 564*, 608-611
Norepinefrină v. noradrenalină
NPY (neuropeptid Y) 633*
NTP v. nucleozid trifosfat
Nuclează 153, 552
Nucleoproteine 50
Nucleotid 142, 143, 539
Nucleotidază 552
Nucleozid 142, 539
Nucleozidază 547
Nucleozid difosfat 144, 544
Nucleozid difosfat kinază 91, 544
Nucleozid fosforilază 547, 551
Nucleozid kinază 551
Nucleozid monofosfat 143
Nucleozid monofosfat kinază 544
Nucleozid trifosfat 144, 544
Nucleozomi 161, 162
Nutriţie 703

O

O_2^- v. superoxid
OAA v. oxaloacetat
Ochoa, S. 203
OCT v. ornitin-carbamil-fosfat transferază
Octoză 294

Okazaki, R. 167
Oleil-CoA 422
Oligoelemente esenţiale 716, 718*
Oligominerale v. oligoelemente esenţiale
Oligopeptide 29, 30*
Oligozaharide 294, 308-310
Oligozaharid transferază 385
Oligozid v. oligozaharid
OMP 539*, 555, 556
OMP decarboxilază v. orotidilat decarboxilază
Oncogenă 641, 642
Oncogenă-c 641
Oncogenă-v 641
Oncoproteină 641
Operator 220, 221
Operon 219, 220, 221
Opsină 131
Organisme autotrofe 259
Organisme heterotrofe 259, 263
Ornitină 18*, 491, 493, 498
Ornitin-carbamil-fosfat transferază (OCT) 491, 494
Orotacidurie 561
Orotat 539*, 555, 556
Orotidină 539*
Orotidin monofosfat v. OMP
Orosomucoid v. α_1-glicoproteină
Osteoblaşti 671
Osteogenesis imperfecta 700
Osteomalacie
Ovalbumină 38*, 189
Oxalat 94, 507
Oxaloacetat 124, 333, 337, 338, 355, 356, 426, 428, 486, 492
β-Oxidare 418-424
Oxidoreductaze 112
Oxid de azot 581
Oxitocină 30*, 564*, 630, 631
Oze 294
Ozide 294

P

p_{50} ($p_{0,5}$) 102
PAF v. factorul activator al plachetelor
Palade, G. 180
Palindrom 233
Palmitil-CoA 445
Panteteină 430
Parathormon 564*, 593, 594
Pauling, L. 35, 36
PCL v. piruvat carboxiligază
PCR (polymerase chain reaction) 246-248
PDGF v. factorul de creştere eliberat de plachete
Pectine 720
Penicilină 74
Pentoză 294
Pentozurie esenţială 353
PEP v. fosfoenolpiruvat
PEPCK v. fosfoenolpiruvat carboxikinază
Pepsină 13*, 38*, 48*, 72, 86, 481, 482
Pepsină C v. gastricsină
Pepsinogen 481, 482
Peptid C 599, 600
Peptid semnal 598
Peptide 39
Peptidil transferază 210, 214
Permează 219
Peroxid 422
Peroxidare 292, 398
Peroxidază 76
Peroxid de hidrogen 343
Peroxid lipidic 292, 343
Peroxizomi 290, 424
Perutz, M. 43, 104
PG v. prostaglandină
PGE_2 472, 474, 476-478
$PGF_{2\alpha}$ 472, 474, 476-478
PGG_2 v. endoperoxid prostaglandinic
PGH_2 v. endoperoxid prostaglandinic
PGI_2 v. prostaciclină
pH 659, 660*, 661*, 664, 665
pH izoelectric 22*, 24, 48
pH optim 86
pI v. pH izoelectric
Pigmenţi vegetali 719*
Pinealocite 631
Piran 299
Piranoză 299
Piridină 119, 120
Piridoxal 120
Piridoxal fosfat 120, 121, 513, 522
Piridoxamină 120
Piridoxamină fosfat 120, 121, 486
Piridoxină 120
Pirimidină 140, 539
Pirimidinice, baze 140, 539
Pirofosfat 123
Pirofosfatază 269, 271
Pirol 19, 519, 522
Piruvat 72, 115, 118, 124, 275, 286, 326, 329, 355, 486, 488, 494
Piruvat carboxilază v. piruvat carboxiligază
Piruvat carboxiligază 123*, 338, 339, 355, 362

Piruvat dehidrogenază 77, 329-334, 362
Piruvat dehidrogenaz fosfatază 332-334
Piruvat dehidrogenaz kinază 332-334
Piruvat kinază 45*, 75, 275, 326, 327, 355, 362, 363
Piruvat kinază L 326
Piruvat kinază M 326
pK aminoacizi 22*
PLC v. fosfolipază C
Plasmalogeni 404
Plasmide 159, 235, 236
Plasmină 62
Plasminogen 62
PLP v. piridoxal fosfat
pOH 660
Poli A 198
Poli A polimerază 198
Poliadenilare 198
Poliamină 514
Poliizopren 407
Polimorfism molecular al fragmentelor de restricție 255-258
Polinucleotid 149
Polinucleozomi 162, 163
Polipeptid 29
Polipeptid pancreatic 606
Poliozide v. polizaharide
Poliribozomi 215
Polizaharide 294, 310-312, 721
Polizomi v. poliribozomi
Porfină 62, 519-521
Porfinogen 62, 519-523
Porfiria acută intermitentă 526
Porfiria cutanea tarda 527
Porfiria eritropoietică congenitală 528
Porfiria variegata 528
Porfirii 526-529
Porfirii primare 526
Porfirii secundare 526
Porfirină 62, 520, 521, 529
Porfirinogen 62, 520
Porfobilinogen 521-523, 527, 528
Porfobilinogen dezaminază 523
Porfobilinogen sintetază (sintază) 522, 523
Potențial redox 265, 266
Potențial redox standard 266, 283
Potențial de transfer 271, 273
PP_i v. pirofosfat
Prealbumină 52*
Pregnan 413
Pregnandiol 623
Pregnenolonă 612, 613, 614
Pre-β-lipoproteine v. lipoproteine cu densitate foarte mică
Preproinsulină 598
Pribnow, casetă 183
Primază 169
Primer v. ARN inițiator
Primozom 167, 170
Principii imediate 114, 708
Principii nutritive 707, 708*, 709, 736
PRL v. prolactină
Proaccelerină 58*
Procarboxipeptidază 481, 482
Procolagen 676
Procolagenază 677
Proconvertină 58*
Produse alimentare 723, 735*
Produse alimentare de origine animală 724-728
Produse alimentare de origine vegetală 728-732
Produse zaharoase 732
Produs ionic al apei 658, 659, 663
Proelastază 481, 482
Proelastină 680
Proenzimă v. zimogen
Progesteronă 572, 614, 615, 622, 623
Progestine 622, 623
Prohormon 130, 133
Proinsulină 598, 599
Prolactină 564*, 624, 628, 629
Prolil hidroxilază 673
Prolină 16*, 19, 22*, 129, 484, 495, 497, 516, 517, 673
Promotor 183, 184, 187, 220, 221
Proopiomelanocortină 626, 627
Propionil CoA 358, 499
PropionilCoA carboxilază 358, 499
Prostaciclină 472, 474, 478
Prostaciclin sintază 474
Prostaglandină 471, 472, 474, 476, 477, 478, 710
Prostaglandină E_2 472, 474, 476, 477, 478
Prostaglandină $F_{2\alpha}$ 472, 474, 476, 477, 478
Prostaglandin sintază v. ciclooxigenază
Proteaze 70
Proteină G 217, 573-575
Proteină G_i 575, 576
Proteină G_o 575
Proteină G_p 575, 581, 582
Proteină G_s 575, 576
Proteină reactivă C 52*, 61, 694
Proteină Y 532, 536
Proteină Z 532, 536
Proteine 30, 711, 735
Proteine complete 713
Proteine incomplete 713

Proteine plasmatice 51, 52*
Protein fosfatază 577-580
Protein kinază 566, 577-580
Protein kinază A 577, 578, 579
Protein kinază C 581, 582
Protein tirozin kinază 585, 642
Proteoglicani 388-393, 682, 687, 688*, 689, 690, 692
Proteoglicani polianionici 672
Protooncogenă 641
Protoporfirie 528
Protoporfirină 63, 520
Protoporfirină IX 520-525, 527, 528
Protoporfirinogen 63, 520
Protoporfirinogen IX 524
Protoporfirinogen oxidază 524
Protrombină 58*, 59, 60, 137
Provitamine 131, 133
PRPP 540, 541, 555, 556, 560
PRPP sintetază 540, 541, 554, 560
Pseudocolinesterază 110
Pst I 234*
Pseudouridină 179
Psicoză 297
Pteridină 126
Pteroilheptaglutamat 127*
Pteroilmonoglutamat 127*
Pteroilpentaglutamat 127*
PTH v. parathormon
Punct de fierbere 654
Punct de topire 654
Punte disulfurică v. legătură disulfurică
Purină 140, 290, 539
Purinice, baze 140, 539
Purin nucleozid fosforilază 547
Puromicină 218*
Putresceină 514

R

Racemază 113
Racemic 297
Radical fenoxi 136
Radical hidroxil 528
Radical peroxi 136, 398
Radical poliizoprenoidic 137
Radical superoxid v. superoxid
Reacţie anaplerotică 340
Reacţie endergonică 67, 68, 263, 266
Reacţie endotermă 68
Reacţie exergonică 67, 68, 263, 266
Reacţie exotermă 68
Reacţie polimerazică în lanţ 246-248
Reacţie protolitică 662
Reacţie van den Berg 535
Reacţii cuplate 266, 284
Receptor 564-571, 694*
Receptor adrenergic 566, 567, 612
Receptor α-adrenergic 610, 612
Receptor β-adrenergic 566, 567, 610, 612
Receptor colinergic 567
Receptor colinergic muscarinic 567
Receptor colinergic nicotinic 567
Receptor nuclear 569, 570
Receptorul factorului de creştere a epidermei (EGF) 568, 569
Receptorul hormonilor tiroidieni 570
Receptorul hormonilor steroidici 570
Receptorul insulinei 568, 569, 600
Receptorul LDL 465
Reglare alosterică a enzimelor 97
Reglare covalentă a enzimelor 107
Renaturarea ADN 150, 151, 152
Renină 617, 618
Repararea ADN 225, 230
Replicare (a ADN) 139, 162, 163, 165, 172
Replicare semiconservativă 163
Replicator 165
Replicază v. ARN polimerază ARN-dependentă
Replizom 164, 166, 170
Represor 220
Restrictază v. enzimă de restricţie
Resturi chilomicronice 462
Reticulină 671
Retinal 131, 410
Retinal izomerază 131
Retinoid 130
Retinol 130, 131*, 132*, 253
Retroinhibiţie 98
Retrovirus 175
Revers transcriptază 174, 175
RH v. hormon de eliberare a tropinelor hipofizare
Ribitil 117
Ribitol 117
Riboflavină 117
Ribonuclează 33*, 38*, 546
Ribonuclează P 73, 74, 198, 199
Ribonucleotid 142, 143
Ribonucleozid 142
Ribonucleozid reductază 545
Ribotimidină 179
Riboză 140, 175, 296
Riboză-5-fosfat 345, 540, 541
Riboză-5-fosfat cetoizomerază 345
5'-P-Ribozil-aminoimidazol 541, 542
5'-P-Ribozil-aminoimidazol – carboxamidă 541, 542

5'-P-Ribozil-aminoimidazol carboxilat 541, 542
5'-P-Ribozil-aminoimidazol succincarboxamidă 541, 542
5'-P-Ribozil-formamido-imidazol-carboxamidă 541, 542
5'-P-Ribozil-N-formilglicinamidă 541, 542
5'-P-Ribozil-N-formilglicinamidină 541, 542
5'-P-Ribozil-glicinamidă 541, 542
Ribozim 191, 199
Ribozomi 180, 181, 208-215
Ribuloză 297
Ribuloză-5-fosfat 344, 345
Ribuloză-5-fosfat epimerază 345
Rifampicină 188, 218*
RIH v. hormon inhibitor al eliberării de tropine hipofizare
Rodopsină 131, 567, 568, 581
Rotenonă 282

S

S v. entropie
S, fază a ciclului celular 173
Saccharopină 502
Salifiere 47, 51
Salmină 48*
Saponine 721
SAM v. S-adenozil-metionină
Sanger, F. 32, 250-252
Schiff, baze 26
Scualen 408, 451, 454
Secretină 562, 564*, 607
Secvenţa Embden-Meyerhof-Parnas v. glicoliză
Sedoheptuloză-1,7-bisfosfat 349, 350
Sedoheptuloză-7-fosfat 346
Seleniu 136
Semiacetal 298
Semicetal 298
Semitisacetal 323
Serie sterică D 297
Serie sterică L 297
Serină 16*, 19, 22*, 122, 390, 445, 488, 495, 509*, 684*, 689
Serin dehidratază 496
Serin-hidroximetil-transferază 496
Serotonină 514, 632
Serum albumină 13*, 38*, 48*, 52*, 53
Sex hormone-binding globulin (SHBG) 623
Sferă de solvatare 655, 656
Sfingoglicolipide 405-407
Sfingolipide 404-407, 445-448
Sfingolipidoze 446
Sfingomieline 400*, 405, 445
Sfingomielinază 446, 447
Sfingozină 404, 445
Sialidază 447
Siderofilină v. transferină
Silencer (secvenţă) 187
Sindecan 693*
Sindrom Crigler Najjar tip I 535
Sindrom Crigler Najjar tip II 535
Sindrom Dubin Johnson v. icter idiopatic cronic
Sindrom Ehlers Danlos 700
Sindrom Hunter 393*, 701
Sindrom Hurler 393*, 701
Sindrom Lesch-Nyhan 554
Sindrom Marfan 700
Sindrom Maroteaux-Lamy 393*
Sindrom Menkes 700
Sindrom Rotor 536
Sindrom Sanfilippo 393*
Sindrom Wernicke-Korsakoff 351
Sintrofie 260
Sis 642
Sistem redox 266
Sistem tampon 664, 665, 668, 669
Sistem termodinamic deschis 261
Sistem termodinamic izolat 260
Sistem termodinamic închis 260
Situs A (aminoacid) 181, 209, 210
Situs P (peptid) 181, 210, 211, 212
SNURP 193, 194
SOD v. superoxid dismutază
Somatomamotropină corionică 628
Somatomedină C v. IGF I
Somatomedine 628, 637
Somatostatină 237, 604, 605, 633*
Somatotropină 13*, 564*, 624, 628, 629
Sorbitol 305, 381, 382
Sorbitol dehidrogenază 111, 381, 382
Sorboză 297
Southern , tehnică 152, 253-255
Southern, E. 253
Specificitate de reacţie 70
Specificitate de substrat 70, 71
Specificitate stereochimică 70, 72
Specii reactive ale oxigenului 290*
Spectrină 13*
Spermidină 514
Spermină 514
Spirala lui Lynen 418
Splicozom 193
Src 641
Stare de întreţinere, v. echilibru energetic
Stare de tranziţie 68
Starling, E. 562
Steran 410
Stercobilină 534
Stercobilinogen 534
Steroizi 410-415, 509

Steroli 411, 721
Stereospecificitate 73
Streptomicină 218*
Structură cuaternară a proteinelor 45
Structură primară a proteinelor 32
Structură secundară α a proteinelor 35
Structură secundară β a proteinelor 39
Structură terţiară a proteinelor 40
Structură dublu elicoidală a ADN 156
Structură în foaie plisată v. structură secundară
Substanţă P 608, 633*
Substanţă amfipatică 657
Substanţă apolară 656
Substanţă hidrofilă 657
Substanţă hidrofobă 657
Substanţă polară 656
Substanţe alimentare bioactive 719, 720
Substanţe tampon 664
Subunitatea sigma (a ARN polimerazei) 183, 184
Succinat 94, 336, 425
Succinat-CoQ reductază 282
Succinat dehidrogenază 73, 118, 279, 282, 337
Succinil-CoA 275, 336, 425, 499, 500, 521, 522
Succinil-CoA-acetoacetat tioforază 336
Succinil-CoA sintetază 275, 336
Succinil-CoA tiokinază v. succinil-CoA sintetază
Suc gastric 481
Suc intestinal 481
Suc pancreatic 481
Sucroză v. zaharoză
Sulfanilamidă 94
N-Sulfat-galactozamină 303
Sulfatid 406
Sulfatidază 447
Superelice de ADN 158
Superoxid (anion sau radical) 290-292, 343, 528
Superoxid dismutază 76, 291, 292
Surfactant pulmonar 401, 404
Sutherland, E. 572
Şuntul pentozo-fosfaţilor v. calea pentozo-fosfaţilor
Syn, formă 145

T

T_1 v. monoiodotironină
T_2 v. diiodotironină
T_3 v. triiodotironină
rT_3 v. 3,3',5'-triiodotironină
T_4 v. tetraiodotironină
Tagatoză 297
Talasemie β 190
Taloză 296
Tamponare 664, 665
Taninurie 719*, 721
Taq polimerază 246
Taq I 234*
TATA, casetă 187
Taurină 414, 518
Taurocolat 414, 456, 457
Tautomerie imino-amino 141
Tautomerie lactim-lactam 140
TBPA (thyroxine-binding prealbumin) 589
TBG (thyroxine-binding globulin) 589
Tbx v. tromboxan
TCA v. acid tricarboxilic
TDP (sau dTDP) 539*
TEBG (testosterone-estrogen-binding globulin) 621
Telopeptid 676
Temperatură de topire a ADN 150
Temperatură optimă de acţiune a enzimelor 85
Teoria cuplării chemiosmotice 284, 285, 289
Teoria cuplării chimice prin intermediari comuni 284
Teoria cuplării conformaţionale 284
Terapie genică 245
Terminal transferază 236
Terminarea replicării ADN 165, 167
Terminarea transcrierii ADN 182, 185, 186
Terminarea sintezei lanţului polipeptidic 206, 214, 215
Termodinamică 260
Termogeneză 705
Termogenină 283
Termoliză 705
Terpene 407-409
Testosteronă 564*, 618-621
Tetraciclină 218*
Tetrahidrobiopterină 503, 506, 609
Tetrahidrofolat 127, 129*, 496
Tetrahidrol 651
Tetraiodotironină 289, 509, 564*, 586-592
Tetroză 294
TGF (transforming growth factor) 636
TGF β 636
THF v. tetrahidrofolat
Tiamină 115
Tiamin pirofosfat v. TPP
Timidilat v. TMP
Timidilat sintază 558
Timidină 539*
Timidin difosfat 539*
Timidin monofosfat 539*
Timidin trifosfat 539*
Timină 140, 141, 154
6-Tioadenină 146, 148
Tioaminoacid 20
Tioetanolamină v. cisteamină
Tioeter 20
6-Tioguanină 146
Tiokinază 271, 418

Tiol 20
Tiolază 420, 424, 425
Tioredoxină 545
Tiosemiacetal v. semitioacetal
Tiouridină 179
Tireoglobulină 48*, 587-589
Tireoperoxidază 587-589
Tireotropină 564*, 590, 591, 624, 629, 630
Tironină 586
Tiroxină v. tetraiodotironină
Tirozinază 76
Tirozină 16*, 19, 22*, 130, 482, 503*, 505*, 506
Tirozinhidroxilază 507, 609
TMP (sau dTMP) 128, 144, 558
TNF (tumor necrosis factor) 640
TNF α 640
TNF β 640
Tocoferol 135*, 293, 409
Tocol 135
Topoizomerază 158, 164
Topoizomerază I 166
Topoizomerază II 164, 166
Topoizomeri 158
Toxina difterică 218*
TPP 115, 329, 336, 346, 507
Traducere 139, 203, 206
Transacetilază 219
Transacilază 430
Transaldolază 346, 347
Transaminare 120, 121*, 485*, 487, 488
Transaminază v. aminotransferază
Transcetolază 346, 347
Transcortină 615
Transcriere 139, 181, 187
Transcriere inversă 201
Transcriptază inversă v. revers transcriptază
Transdezaminare 486
Transfecţie 232
Transferază 112
Transferază terminală 236
Transferină 13*, 52*, 529
Translocază 207, 481
Transsulfurare 120, 122, 497
Treonină 16*, 19, 22*, 97, 483, 485, 495*, 684*
Treonin aldolază 496
Treonindehidratază 99
Treoză 296
TRH v. hormon eliberator al tireotropinei
Triacilglicerol 397, 398, 435-441
Triacilglicerol lipază 415, 436, 602
Tributirină 397
Triglicerid v. triacilglicerol
Trigliceride serice 458*
Triglicerid lipază v. triacilglicerol lipază
2,4,8 -Trihidroxipurină v. acid uric
Triiodotironină 564*, 586-592
3,3',5'-triiodotironină 589, 590
Trioleină 397, 398
Trioză 294
Triozofosfat 323
Triozofosfat izomerază 323
Tripsină 72, 481-483, 671
Tripsinogen 481
Triptofan 16*, 19, 22*, 129*, 484, 486, 497, 504, 514, 632
Triptofan hidroxilază 507
Trisialogangliozid 406
Tristearină 397, 398
Trizaharid de legătură 693
Trizaharid sulfatat 694
Trombină 58*, 59-61, 694
Trombomodulină 58*, 61, 693*, 694
Tromboxan 472, 710
Tromboxan A_2 472, 474, 478
Tromboxan B_2 472, 474
Tromboxan sintază 474
Tropocolagen 675*
Tropomiozină 195, 197
TSH v. tireotropină
TSH-RH v. hormonul eliberator al tireotropinei
TTP (sau dTTP) 164, 539*
Turgescenţă 694*
TX v. tromboxan
TXA_2 v. tromboxan A_2
TXB_2 v. tromboxan B_2
Ţesut glucodependent 353

U

Ubichinonă v. coenzima Q
UDP 539*, 557
UDP-N-acetil-galactozamină 446
UDP-galactoză 378, 446
UDP-galactoză pirofosforilază 378
UDP-glucoză 271, 351, 352, 371, 446
UDP-glucoză---->galactoză-1-fosfat uridil transferază 378, 379
UDP-glucozo-4-epimerază 378
UDP-glucoză-pirofosforilază 351, 371
UDP-glucuronat 351, 352, 533
UDP-glucuronil transferază 533, 535
U.I. 84
Uleiuri eterice 719*
UMP 144, 539*
Up-regulation 566
Uracil 140, 141, 175
Urat monosodic 552, 553
Urat oxidază 553
Urează 71, 110

Uree 71
Uremie 493
Ureotelic, organism 552
Uricază 553
Uricotelic, organism 552
Uridină 142, 539*
Uridin difosfat v. UDP
Uridin monofosfat v. UMP
Uridin trifosfat v. UTP
Urobilină 534
Urobilinogen 534, 536
Urocanat hidratază 498
Uroporfirină 62
Uroporfirinogen 62
Uroporfirinogen I 523, 527
Uroporfirinogen III 523, 527
Uroporfirinogen III cosintază 523, 528
Uroporfirinogen decarboxilază 523, 527
UTP 164, 271, 539*, 557

V

v-erb 642
v-src 642
V_H 56
V_L 56
Valină 14, 15*, 22*, 483, 499*
Valoarea biologică a proteinelor 712
Vasopresină 30*, 564*, 630, 631, 648, 649
Vector 233
Vector de clonare 233
Vector de expresie 243
Vector retroviral 243, 244
Verdoglobină 529
VIP (vasoactive intestinal polypeptide) 607, 633*
Virusul imunodeficienţei umane 175
Vitamere 114, 118, 126, 133
Vitamina A v. retinol
Vitamina antipernicioasă v. cianocobalamină
Vitamina B_1 v. tiamină
Vitamina B_2 v. riboflavină
Vitamina B_6 vezi piridoxină
Vitamina B_{12} vezi cianocobalamină
Vitamina C v. acid ascorbic
Vitamina D_2 v. ergocalciferol
Vitamina D_3 v. colecalciferol
Vitamina E v. tocoferol
Vitamina K_1 v. filochinonă
Vitamina K_2 v. menachinonă
Vitamina K_3 v. menadionă
Vitamina PP v. niacină
Vitamine 114, 707*
Vitamine hidrosolubile 114, 713
Vitamine liposolubile 114, 130, 710, 713, 735
Viteză reacţie 83
Viteză maximă 88, 90, 92
VLDL v. lipoproteine cu densitate foarte mică

W

Watson, J. 154, 155
Watson şi Crick, model 155, 156
Wilkins, M. 154, 161

X

Xantină 290, 539*, 548, 549
Xantin oxidază 290, 549, 552
Xantozină 539*
Xantozin monofosfat v. XMP
Xantozin difosfat v. XDP
Xantozin trifosfat v. XTP
XDP 539*
Xilitol 353, 354
Xilitol dehidrogenază 353, 354
Xiloză 296, 382, 390, 684*
Xiluloză 297, 353, 354
D-Xiluloză 353, 354
L-Xiluloză 353, 354
Xiluloză-5-fosfat 345, 346
XMP 539*, 542,543
XTP 539*

Z

Z, ADN 145, 156, 157
Zaharază 309, 314, 315
Zaharoză 309
Zaharuri v. glucide
Zidovudină v. azidotimidină
Zimogen 108, 481
Zinc 76
Zona fasciculata 612
Zona glomeruloza 612
Zona reticularis 612

BOUASHA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-39-0299-3

Redactor: dr. farm. **ELENA HAŢIEGANU**
Tehnoredactare: **PRIMAVERA PANAIT**
Machetare: **MIHAI ŞTEFĂNACHE**
Grafică computerizată: **IONEL NICOLAEV**
Secretar de redacţie: **MARIA NEAMŢ**

Bun de tipar: 30.051996 *Formatul*: 16/70 x 100
Hârtie: scris I a 70 x 100 *Coli de tipar*: 48,50

Pregătirea formei şi tiparul executate
sub comanda nr. 60 266

Regia Autonomă a Imprimeriilor
Imprimeria „CORESI" Bucureşti
România

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-39-0239-5

Informăm cititorii cărții medicale că pot procura cartea dorită de la

• sediul Editurii Medicale – București, Str. Smârdan nr. 5, etaj III, tel. 614.32.52; fax 312.48.79

sau

• librăria Editurii Medicale – în incinta Universității de Medicină și Farmacie – București, Bd. Eroilor Sanitari nr. 8

EM

EDITURA MEDICALĂ

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY